

UNTERSUCHUNGEN ZUM RNA-SPLICING IN KLASSE II-INTRONS VON
HEFEMITOCHONDRIEN:
SEQUENZIERUNG VON INTRONMUTATIONEN UND MOLEKULARE ANALYSE EINES
KARYOTISCHEN SUPPRESSORGENS

Cornelia D. Schmidt

**UNTERSUCHUNGEN ZUM RNA-SPlicing IN KLASSE II-INTRONS VON
HEFEMITOCHONDRIEN:
SEQUENZIERUNG VON INTRONMUTATIONEN UND MOLEKULARE ANALYSE EINES
KARYOTISCHEN SUPPRESSORGENS**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Cornelia D. Schmidt

Juli 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R.J. Schweyen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 10. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	
1.	Abkürzungen	16
2.	Feinchemikalien	17
3.	Enzyme	17
4.	Radiochemikalien	17
5.	Sonstiges	18
6.	Genetische Bezeichnungen und Abkürzungen	18
7.	Stämme	19
8.	Medien und Puffer	20
9.	Methoden	21
9.1	Induktion und Isolierung von Revertanten	21
9.1.1	Manganchlorid-Mutagenese	21
9.1.2	MMS-Mutagenese	21
9.2	EB-Mutagenese zur Induktion von rho ⁺ -Stämmen	21
9.3	Umkreuzung von mit ⁻ -Mutanten mit den Kernfusions- mutanten IC8/AA1 bzw. IC11/AA2	22
9.4	Rekombinationskreuzung	22
9.5	Tetradenanalyse	22
9.6	Anzucht von Hefe- und Bakterienkulturen	23
9.6.1	Anzucht von Hefekulturen zur Isolation mt DNA	23
9.6.2	Anzucht von Hefekulturen zur Isolation von RNA	23
9.6.3	Anzucht von Hefekulturen für die Transformation	23
9.6.4	Anzucht von E. coli-Zellen zur Isolierung von Plasmid-DNA	23
9.6.5	Anzucht von E. coli-Zellen zur Transformation	24
9.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefe- und Bakterien- kulturen	24
9.7.1	Isolierung von mt DNA aus S. cerevisiae	25
9.7.2	Isolierung von genomischer DNA aus S. cerevisiae	25
9.7.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	25
9.7.3.1	Präparative Methode	25
9.7.3.2	Schnelle Plasmidpräparation (Minipräp.) aus E. coli	25
9.7.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	26
9.7.5	Isolierung von RNA aus Hefetransformanten	26
9.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	26
9.9	Restriktion und Gelelektrophorese von DNA	27
9.10	Isolierung von DNA aus Agarose- bzw. Acrylamidgelen	27
9.11	Radioaktive Markierung von DNA	27
9.11.1	Nicktranslation	27
9.11.2	3'-Endmarkierung	27
9.11.3	5'-Endmarkierung	28
9.12	Southern-Analyse von DNA	28
9.13	Northern-Analyse	28
9.14	Dehybridisierung	28
9.15	Dephosphorylierung	28
9.16	Ligation von Fragmenten mit den Vektoren pBR322, YEpl3, M13	29
9.17	Transformation von E. coli-Stamm SF8 (recA ⁺) bzw. 490 (recA ⁻)	29

9.18	Transformation von JM101 bzw. BMH1/1 mit M13	29
9.19	Transformation von Hefe	29
9.20	DNA-Sequenzanalyse	30
9.20.1	Methode nach Maxam-Gilbert	31
9.20.2	Dideoxymethode nach Sanger	31
9.20.2.1	Präparation von "template"-DNA	
9.20.2.2	Hybridisierung von Primer-DNA an das "template" (Annealing)	31
9.20.2.3	Sequenzierungsreaktionen und Sequenzlauf	31

III. ERGEBNISSE

1.	Mutationen in der bII-Sequenz	33
2.	Revertanten zu bII-Mutanten	37
2.1	Isolierung von Revertanten	38
2.2	Genetische Charakterisierung von Revertanten	39
2.2.1	Bestimmung des Vererbungsmodus	39
2.2.2	Rekombinationsanalyse der mt Revertanten	42
2.3	Charakterisierung von mt Revertanten durch die DNA-Sequenzanalyse	43
2.3.1	WT- und Pseudo-WT-Revertanten	43
2.3.2	Reversion durch Introndeletion	47
3.	Charakterisierung einer Kernrevertante	53
3.1.1	Temperatursensitivität	53
3.1.2	Allelspezifität	55
3.2	Klonierung des komplementierenden Allels	56
3.2.1	Erstellung einer Genbank	57
3.2.2	Konstruktion eines Empfängerstammes	60
3.2.3	Komplementationstest	61
3.2.4	Verifizierung des extrachromosomalen Vererbungsmechanismus	62
3.3	Physikalische Kartierung des klonierten Fragmentes	64
3.3.1	"Southern-cross-blot"- Verfahren	65
3.3.2	Southern-Analyse von Einzel- und Doppelrestriktionen	66
3.4	Subklonierung	69
3.5	Sequenzierung	72
3.6	"Gene-Disruption"	84
3.7	Bestimmung der Kopienzahl	85
3.8	Zuordnung des isolierten Fragments zu einem Chromosom	87
3.9	Transkriptstudien	90

IV.	DISKUSSION	
1.	Zielsetzung	91
2.	Mt Revertanten	93
3.	Introndeletion	96
4.	Proteine und RNA-Spleißen	102
4.1	"RNA-Maturasen" und andere Intron-kodierte Proteine	102
4.2	Kernproteine	104
4.3	Das Kern-kodierte N3-Genprodukt	105
4.4	Proteine und Intron-"Selfsplicing"	110
4.5	Mögliche Funktion des N3-Proteins	111
4.6	Evolution	114
V.	ZUSAMMENFASSUNG	118
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	120



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

1. Das mt Genom

Die Biogenese der Mitochondrien erfordert ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem Genom dieser Organelle und dem des Zellkerns. Nach der Anzahl der Gene für mt Proteine kommt dabei dem Kerngenom die wichtigere Rolle zu; es kodiert z.B. neben vielen Strukturproteinen der Membranen auch alle Enzyme für die Replikation und Transkription der mt DNA und - mit wenigen Ausnahmen - die Proteine mt Ribosomen (Übersicht: Dujon, 1983; Douglas und Takeda, 1985).

Einige Gene scheinen im Laufe der Evolution ihren Kodierungsort gewechselt zu haben; so finden sich die Gene des Komplex I der Atmungskette in der mt DNA des Menschen, nicht aber in der mt DNA von Hefe. Andere Gene aber sind bei allen bisher im Detail bekannten mt Genomen vorhanden und möglicherweise obligat in diesem Genom lokalisiert (vgl. Abb.1; Borst, 1981; Dujon, 1983; Grivell, 1983). Dies sind die Gene für:

-rRNA (2 Spezies)

-tRNA (25 Spezies)

-Proteine des Cytochrom c-Oxidase-Komplexes (3 Untereinheiten),
Cytochrom b; ATP-Synthetase-Komplex (2-3 Untereinheiten);

Der phylogenetische Ursprung des mt Genoms wird im Bereich atmender, prokaryontischer Zellen gesucht, die sich der Symbiontenhypothese (Bogorad, 1975) zufolge in die Eukaryontenzelle integriert haben. Im Laufe der Evolution wurden deren Gene teils in den Zellkern transferiert, teils völlig eliminiert; nur zu einem geringen Teil sind sie im Genom der Zellorganelle selbst erhalten

geblieben. Gründe dafür, daß die genannten Gene im Organellengenom verbleiben mußten, sind nicht bekannt.

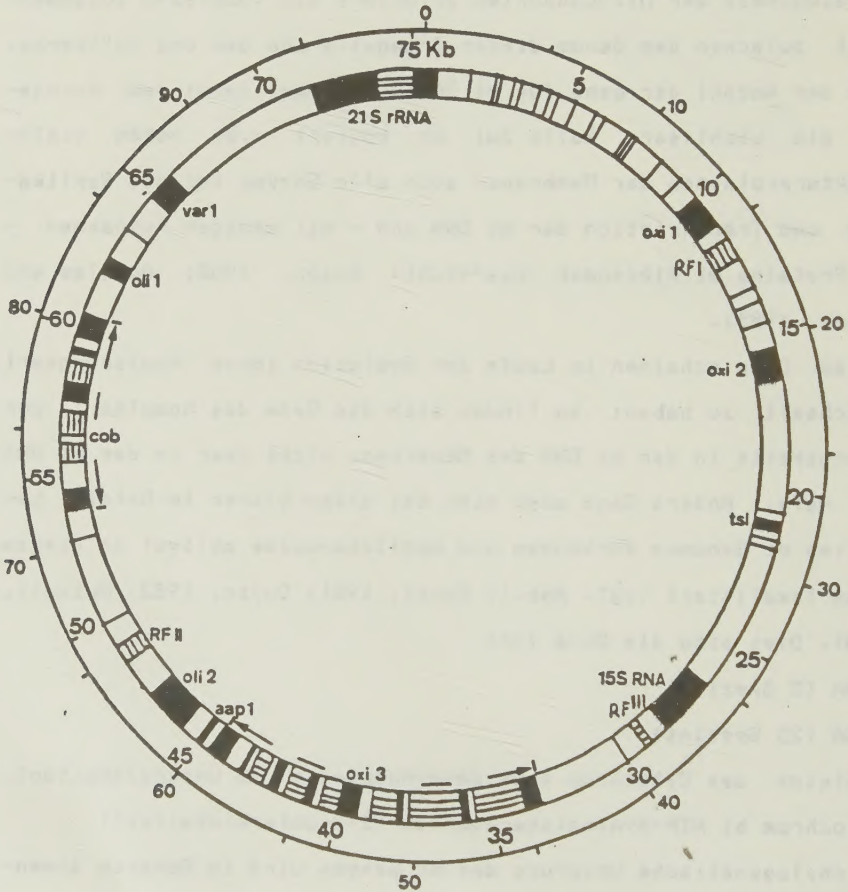


Abb.1: Genetische Karte des mt Genoms von *Saccharomyces cerevisiae*; Exonanteile sind durch schwarze Segmente, offene Leserahmen in Introns durch schraffierte Segmente dargestellt. Dünne, radiale Linien kennzeichnen die Lage der tRNA-Gene. Das Genom kodiert für 8 Proteine (COB, OXI 1, 2, 3, OLII, 2, AAP1 und VAR1) sowie 3 Leserahmen unbekannter Funktion (RFI, II, III); daneben für 25 tRNAs und 2 rRNA Spezies 15S, 21S); Abb.: nach Dujon, 1983

In der mt DNA von *Saccharomyces cerevisiae* wurden neben den ubiquitären Genen einige zusätzliche offene Leserahmen (ORF) entdeckt (Übersicht: Dujon, 1983; Grivell, 1983). Einer dieser ORFs, als VAR1 bezeichnet, kodiert für ein Ribosomen-assoziiertes Protein (Terpstra et al., 1979). Andere kommen bevorzugt in den Introns vor und dürften für Proteine kodieren, die beim RNA-Spleißen oder auch bei Intron-DNA-Insertionen von Bedeutung sind (Dujon, 1980; Lazowska et al., 1980; Weiss-Brummer et al., 1982). Obwohl also die mt DNA in allen eukaryontischen Systemen in etwa für die gleichen Produkte kodiert, variiert ihre Größe und Struktur bei verschiedenen Organismen beträchtlich. Die Größe des mt Genoms von Säugern und Insekten beträgt 14-18 kbp (Anderson et al., 1981), von Pilzen 19-85 kbp (Sanders et al., 1977; Zamaroczy und Bernardi, 1985); das mitochondriale Genom der Pflanzen ist mit 200-2700 kb sehr komplex (Leaver et al., 1984). Die Größenunterschiede zwischen verschiedenen Spezies lassen sich auf eine unterschiedliche Organisation der Gene und Genome zurückführen, die besonders offensichtlich bei einem Vergleich zwischen Pilzen und Säugern ist. Bei Säugern ist das mt Genom äußerst kompakt organisiert, die Gene sind dicht gepackt und teils überlappend angeordnet; Introns und ausgedehnte intergenische Bereiche fehlen (Attardi et al., 1982; 1985; Saccone et al., 1985). Bei *S. cerevisiae* dagegen wird das mt Genom zu zwei Dritteln von AT-reichen, intergenischen Sequenzabschnitten ("Spacern") eingenommen, die keine kodierende Funktion besitzen. Der GC-Gehalt von kodierenden Sequenzen liegt bei 25%, wogegen der GC-Gehalt intergenischer Sequenzen, zusammengesetzt aus reinen AT-Sequenzen und eingeschob-

benen, extrem GC-reichen Clustern, im Mittel ca. 15% beträgt (Zamaroczy und Bernardi, 1985).

2. Introns in mt Genen

Eine Variabilität in der Größe des mt Genoms zeigt sich jedoch nicht nur zwischen verschiedenen Organismen, sondern kann auch innerhalb einer Spezies beobachtet werden. In den Mitochondrien von *S. cerevisiae* finden sich Introns innerhalb der Gene für Apocytochrom b (COB; Nobrega und Tzagoloff, 1980; Schmelzer et al., 1981), für die Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase (OXI3; Bonitz et al., 1980) und für die 21S-rRNA (Faye et al., 1979; Dujon et al., 1980). Es wurde gezeigt, daß sich verschiedene WT-Stämme in der Anzahl der Introns im mt Genom unterscheiden. Dem mt Genom des Stammes D273-10B, beispielsweise, fehlen die Introns 15a und 15b der Cytochrom-Oxidase-Untereinheit I sowie die Introns 1-3 von Apocytochrom b; es ist deshalb um 6600 bp kürzer als der WT-Stamm KL14-4A mit 85100 bp (Nobrega und Tzagoloff, 1980). Der Stamm *S. carlsbergensis* ist zusätzlich um weitere drei Introns, Intron 1 und 4 der Cytochrom-Oxidase sowie das Intron in der 21S-rRNA verkürzt (Hensgens et al., 1983). Die stammspezifischen Größenunterschiede beruhen bei Hefe also zumeist auf Insertionen innerhalb der kodierenden Region. Daneben zeigt sich Variation, die auf Insertionen/Deletionen in intergenischen Sequenzen zurückzuführen ist.

Das "Processing" und die Translation der mt Introns können von Mutationen in beiden Genomen, der mt DNA und der Kern-DNA, blockiert werden; diese Mutationen werden als *mit* (mt DNA) oder *pet* (Kern-DNA) bezeichnet. Innerhalb der mt Intronsequenzen sind

zwei verschiedene mit⁻-Mutationstypen bekannt, die das Spleißen verhindern, die sogenannten *cis*- und *trans*-aktiven Mutationen (Lamouroux et al., 1980; Schmidt, unveröffentlicht).

Trans-aktive Mutationen kennzeichnen offene Leserahmen innerhalb von Introns, deren Translationsprodukte für die Exzision der entsprechenden Introns notwendig sind ("RNA-Maturasen"). In *S. cerevisiae* wurden im COB-Gen drei ORFs mit einer solchen Funktion (in bI2, bI3 und bI4) identifiziert (Lazowska et al., 1980; De la Salle et al., 1982; Weiss-Brummer et al., 1982; Holl et al., 1985).

Die Studien von *cis*-aktiven Mutationen haben gezeigt, daß die Existenz bestimmter Intronstrukturelemente, die teilweise in größerer Entfernung von den Exon/Intron-Grenzen liegen, für das mitochondriale Spleißen eine unerlässliche Voraussetzung ist (Schmelzer et al., 1982, 1983; Jacq et al., 1982; Weiss-Brummer et al., 1983; Michel und Dujon, 1983; Waring und Davies, 1984).

Diese drei Typen, *pet*⁻-Mutanten, *cis*-aktive und *trans*-aktive mit⁻-Mutanten sind von großem Vorteil für die Aufklärung des Spleißprozesses.

3. Intronklassen

Durch den Vergleich der theoretisch ermittelten Intron-Sekundärstruktur, sowie der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der offenen Leserahmen lassen sich in den Mitochondrien zwei Intronfamilien unterscheiden: Klasse I und Klasse II (Michel et al., 1982; Michel und Dujon 1983; Waring und Davies 1984). Diese Einteilung umfaßt nicht nur die Introns im mt Genom der Bäckerhefe und anderer Pilze, sondern auch Introns in Mitochondrien-, Chloroplasten- und karyotischen rRNA-Genen bei Protozoen. Mitglieder der-

selben Klasse weisen relativ kurze, konservierte Nukleotidsequenzen und ähnliche Sekundärstrukturelemente auf, welche die 5'- und 3'-Spleißpunkte in enge Nachbarschaft bringen (Abb.2). Zwischen den Introns der Klasse I und II konnten weder hinsichtlich der Sequenz noch hinsichtlich der Struktur Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Beide Typen von Introns wurden als von den Kern-mRNA-Introns verschieden angesehen. Mit den Introns in den kernkodierten tRNA-Präkursoren wurde eine vierte Klasse differenziert.

Im folgenden sollen durch die Gegenüberstellung der Intronklassen Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der Erkennungsstrukturen und der Spleißreaktion deutlich gemacht werden (vgl. A-D und Abb.2 und 3):

A. Spleißen von kernkodierten tRNA-Präkursoren

Das Spleißen kernkodierter tRNA-Präkursoren ist von allen vier Klassen am besten verstanden. Die Struktur des Exonanteils im Spleißsubstrat ist ausschlaggebend (Abelson, 1979); konservierte Sequenzen an den Spleißgrenzen fehlen. Auch interne Intronsequenzen sind für die Funktion des Spleißens nicht essentiell, wie Deletions- oder Insertionsmutationen beweisen (vgl. Übersichtsartikel: Greer und Abelson, 1984). Dagegen zeigen alle bisher untersuchten Vorläufer-tRNA Spezies als gemeinsames Merkmal, daß die Lage des Introns fixiert ist, nämlich ein Nukleotid 3'-seitig vom Antikodon. Durch die Introninsertion wird der Antikodon-"Loop" erweitert, die Sekundär- und Tertiärstruktur der maturen tRNA bleibt jedoch erhalten (vgl. Abb.2). Die Strukturen des Exonanteils sind innerhalb verschiedener Spezies konserviert, so

daß Prä-tRNA Spezies von Hefe im heterologen System exakt gespleißt werden (Guthrie und Abelson, 1983). Der Mechanismus der Spleißreaktion wurde von Peebles et al. (1983) und Greer et al. (1983) aufgeklärt.

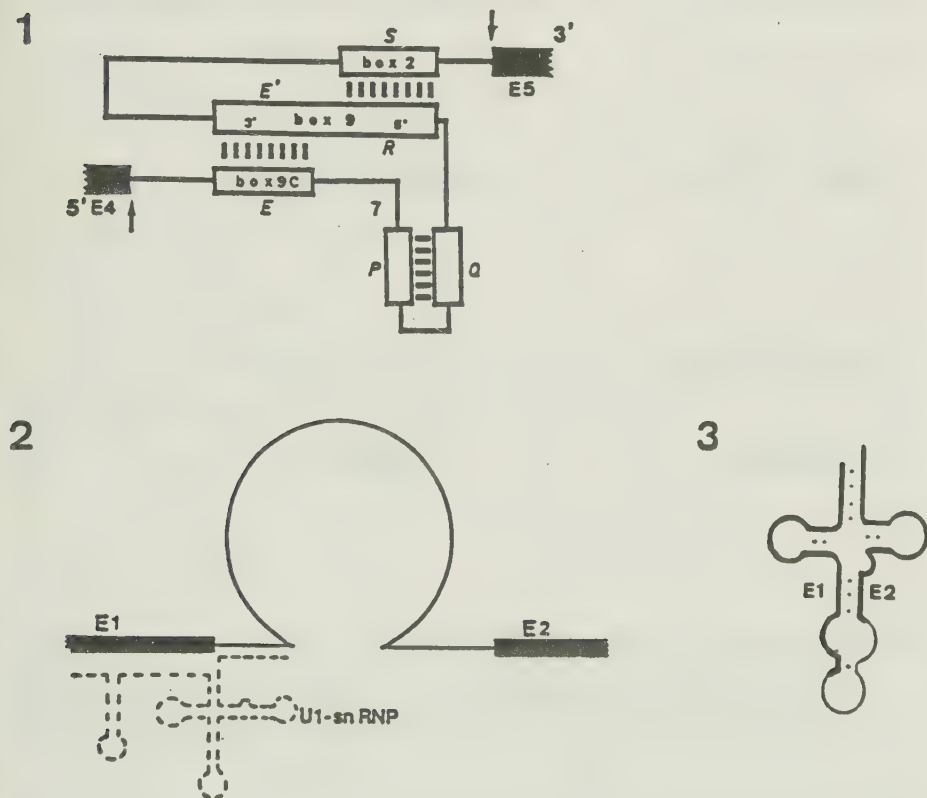


Abb.2: Erkennungsstrukturen für das RNA-Spleißen (1-3):

1. Charakteristisch für Introns der Klasse I und II ist die Bildung einer spezifischen Sekundärstruktur, welche sie zum "Selfsplicing" befähigt; gezeigt ist die schematische Sekundärstruktur von bI4 (Klasse I) bei *S. cerevisiae*. S, R, E, E', P und Q kennzeichnen konservierte Sequenzabschnitte von Klasse I-Introns (nach Holl et al., 1985); vgl. auch Abb.5: bI1 als Vertreter von Klasse II-Introns;

Fortsetzung: Legende zu Abb.2:

2. Das Spleißen von Kern-mRNA-Introns ist charakterisiert durch die Erkennung von konservierten Sequenzen an den Introngrenzen über die Beteiligung der U1-snRNA-Spezies;
3. Spleißen von Kern-tRNA-Prakursoren; es wird die Sekundär- und die Tertiärstruktur des Exonanteils erkannt.

Klasse I-Spleißen

Klasse II/mRNA-Spleißen

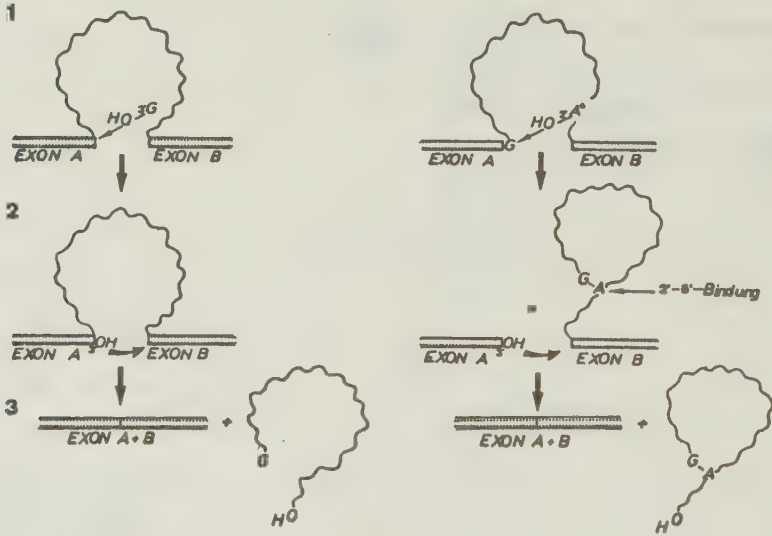


Abb.3: Mechanismus des Spleißprozesses bei Introns der Klasse I, bzw. Klasse II/Kern-mRNA. An der Intronexzision sind zwei Transesterifikationsreaktionen beteiligt (Schritte 2 und 3). Der markierte (*) Adenosinrest liegt innerhalb einer konservierten Sequenz (vgl. Text); Abb.: nach Cech, 1986

B. Intronspleißen bei mRNA-Genen des Zellkerns

Innerhalb dieser Klasse sind kurze Sequenzen am 5'- und 3'-Ende konserviert, sowie bei niederen Eukaryonten eine interne Sequenz in der Nähe des 3'-Spleißpunktes, die sogenannte TACTAAC-Box (Langford und Gallwitz, 1983), welche bei höheren Eukaryonten durch eine weit weniger spezifische Sequenz (PyXPuTPuAPy) defi-

niert ist (Keller und Noon, 1984). Eine gemeinsame Sekundärstruktur aller mRNA-Introns ist nicht vorhanden. Deletionen oder Mutationen an den Spleißgrenzen oder innerhalb der TACTAAC-Box verhindern das Spleißen, während umfassende Deletionen interner Bereiche dieses nicht beeinträchtigen (Langford und Gallwitz, 1983; Wieringa et al., 1983; Brody und Abelson, 1985). Die Konservierung derselben Sequenzabschnitte, sowie die Verwendung eines Spleißmechanismus zeigen, daß dieses Prinzip vor der divergenten Entwicklung von Pflanzen, Pilzen und Vertebraten existiert hat; dies wird zusätzlich dadurch dokumentiert, daß Intron-enhaltende Hefegene in Säugetierextrakten exakt gespleißt werden (Sharp, 1985).

Der Spleißmechanismus für mRNA-Präkursoren ist in Abb.3 wiedergegeben. Im ersten Schritt wird das Primärtranskript am 5'-seitigen Exon/Intron-Übergang geschnitten und gleichzeitig der konservierte Guanosinrest am freien 5'-Intronende über eine ungewöhnliche 2'-5'-Phosphodiesterbindung mit einem Adenosinrest innerhalb der TACTAAC-Box verknüpft. Auf diese Weise entsteht die sogenannte RNA-Lariatstruktur als Zwischenprodukt (Keller, 1984). Im folgenden Schritt wird die Phosphodiesterbindung am 3'-Ende unter gleichzeitiger Ligation der Exons gelöst und das Intron in Lariatform exzisiert (Krainer et al., 1984; Grabowski et al., 1984; Padgett et al., 1984; Ruskin et al., 1984).

Das Spleißen dieser Klasse erfolgt nur innerhalb eines umfangreichen Komplexes, an dem mehrere Proteine und sn-RNPs (=small nuclear ribonucleoprotein particles) beteiligt sind (Black et al., 1985). Vermutlich ist durch die Hybridisierung der U1-snRNA mit konservierten Bereichen die Erkennung von 5'-Consensus-

Spleißsequenzen gewährleistet (vgl. Abb.2; Padgett et al., 1983; Krämer et al., 1984), während die U2-snRNA eine Bedeutung bei der Identifikation des "Branchpoints" haben soll (Black et al., 1985). In *S. cerevisiae* wurden die U1- und U2-snRNA identifiziert, eine Beteiligung der snRNA-Spezies am Spleißprozeß ist jedoch nicht nachgewiesen. Auffällig ist eine Sequenzkomplementarität zwischen der TACTAAC-Box und dem 5'-Teil der Introns bei Hefe, die möglicherweise eine intramolekulare Basenpaarung dieser Sequenzen während des Spleißens erlaubt (Keller, 1984). Nicht nur die TACTAAC-Box, auch die 5'-proximalen Sequenzen sind bei Hefe besser konserviert als bei höheren Eukaryonten - eine Tatsache, welche die Interaktion beider Sequenzen wahrscheinlich macht.

C. Spleißen von Klasse I-Introns

Die meisten mt Introns von *S. cerevisiae* gehören dieser Klasse an. Kennzeichnend für die Sekundärstruktur dieser Introns sind kurze Consensus-Sequenzen, die paarweise zueinander komplementär sind und so eine charakteristische räumliche Struktur bedingen. Die Funktion dieser Hybride besteht darin, die 5'- und 3'-Spleißstellen in enge Nachbarschaft zu bringen (Abb.2). Für einige Introns dieser Klasse, nämlich mehrere mt Introns bei Hefe, wurde die Bedeutung solcher Sequenzen, welche oft weit von den Spleißgrenzen entfernt sind, experimentell nachgewiesen (Anziano et al., 1982; De la Salle et al., 1982; Netter et al., 1982; Weiss-Brummer et al., 1982, 1983; Holl et al., 1985).

An einem Vertreter dieser Klasse, dem Intron in der rRNA bei *Tetrahymena*, wurde erstmals gezeigt, daß ein exaktes RNA-Spleißen

autokatalytisch erfolgen kann (Kruger et al., 1982; Cech et al., 1983; Zaugg et al., 1983). Das Intron der 26S-rRNA wird in vitro ohne die Beteiligung von Proteinen oder anderen Komponenten und ohne das Vorhandensein einer Energiequelle aus dem Primärtranskript exzidiert; es wird lediglich ein Guanosincofaktor benötigt. Die Voraussetzung für das "Selfsplicing" ist die Bildung einer bestimmten Sekundärstruktur. Untersuchungen von Price et al. (1986) bei Tetrahymena zeigen, daß auch nicht konservierte Sequenzbereiche obligat sind.

Inzwischen konnte für mehrere andere Klasse I-Introns, mit Introns bei Hefe und Neurospora, ein "Selfsplicing" nachgewiesen werden (Garriga und Lambowitz, 1984; Van der Horst und Tabak, 1985). Der Mechanismus der autokatalytischen Spleißreaktion ist bei allen Mitgliedern der Klasse identisch; er besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungen, so daß die Energie der gelösten Esterbindung zur Bildung einer neuen Esterbrücke verwendet wird. Der Guanosincofaktor wird zum Start der Reaktion benötigt und spaltet die am 5'-Ende des Introns gelegene Phosphodiesterbindung (vgl. Abb.3).

Das exzidierte Intron ist zu einer Kaskade von spontanen Reaktionen befähigt, wobei sich spezifische Spaltung und nachfolgende Circularisation abwechseln (Zaugg und Cech, 1986). Als Ergebnis liegt eine lineare, verkürzte RNA-Intronsequenz vor, die enzymatische Eigenschaften besitzt, wie etwa die Hydrolyse von Oligonukleotiden (Ribozym).

Pet⁻- und mit⁻-Mutationen können in vivo die Exzision von Introns der Klasse I verhindern (Lazowska et al., 1980, Anziano et al., 1982; Weiss-Brummer et al., 1982). Damit ist es wahrscheinlich,

daß in vivo für das Spleißen mancher Klasse I-Introns akzessorische Komponenten benötigt werden. Diese Komponenten verändern vermutlich nichts am grundsätzlichen Prinzip der RNA-Katalyse (vgl. Diskussion).

D. Klasse II-Intron-Spleißen

Charakteristisch für diese Klasse ist neben der spezifischen Sekundärstruktur ein stark konservierter Sequenzabschnitt in den letzten 100 3'-seitigen bp. Die exzisierten Introns liegen in circularer Form vor und sind stabil (Arnberg et al., 1980; Halbreich et al., 1980). Vier der dreizehn Introns des mt Genoms von *S. cerevisiae*, nämlich Intron 1, 2, und 5c in OXI3 (aI1, aI2 und aI5c) sowie Intron 1 in COB (bI1) gehören zu dieser Klasse (Halbreich et al., 1980; Michel et al., 1982; Schmelzer et al., 1982). Neue Arbeiten zeigen, daß zwei Introns der Klasse, aI5c und bI1, autokatalytische Aktivität besitzen (Peebles et al., 1986; Schmelzer und Schweyen, 1986; van der Veen et al., 1986). Die Exzision der Introns erfolgt wie beim mRNA-Spleißen im Kern in Lariatform, welche über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen einem in der Nähe des 3'-Spleißpunktes liegenden "Branch-point" und dem ersten Nukleotid im Intron gebildet wird (vgl. Abb.3). Es ist nachgewiesen, daß die konservierten Sekundärstrukturen der Klasse II-Introns eine Voraussetzung für diese Reaktion sind (Schmelzer und Schweyen, 1986). Einige Vertreter der Klasse II-Introns kodieren für "RNA-Maturasasen" (Carignani et al., 1983) und benötigen daher vermutlich in vivo akzessorische Faktoren in Form von Proteinen oder RNA und Proteinen für die Spleißreaktion. Im Gegensatz zum mRNA-Spleißen im Zellkern sind die Reaktionsbedingungen für die in vitro-Reaktion (bestimmte

Mg²⁺- und Spermidinkonzentration) einfach.

Der Vergleich der Spleißmechanismen bei den verschiedenen Intronklassen zeigt, daß zwar Unterschiede in der Art der essentiellen Erkennungsstrukturen bestehen, die Spleißmechanismen von Kern-mRNA-, Klasse I- und Klasse II-Introns jedoch relativ ähnlich sind.

Introns in der mRNA von Eukaryonten schienen zunächst keine Gemeinsamkeiten mit Klasse I- und Klasse II-Introns zu haben. Zwei Befunde jüngsten Datums stellen sie jedoch in die Nähe der Klasse II-Introns: zum einen bestehen Sequenzhomologien am 5'-Exon/Intron-Übergang - zum anderen konnte gezeigt werden, daß während der Exzision beider Intronotypen, der 5'-G-Rest mit einem A-Rest nahe dem 3'-Ende des Introns eine 2'-5'-Bindung eingeht; daraus resultiert ein circular verzweigtes RNA-Molekül, ein "Lariat". Diese Gemeinsamkeiten sind zwar nicht zwingend im Sinne einer evolutionären Verwandtschaft, es ist aber anzunehmen, daß die ungewöhnliche 2'-5'-Lariatbindung nicht unabhängig für diese beiden Klassen in der Evolution entstanden ist.

Mt Intron-RNA besitzt per se die Fähigkeit zur Lariatbildung, wie in vitro-Studien an Mutanten bewiesen haben (Schmelzer und Schweyen, 1986). Denkbar ist, daß interne konservierte Sequenzen von Klasse II-Introns mit der konservierten Sequenz am 5'-Spleißpunkt durch Hybridbildung eine solche Reaktion erleichtern. Bei karyotischen Prä-mRNA-Spezies mag die katalytische Aktivität auf snRNA-Spezies, unterstützt von Proteinen des RNP-Komplexes übergegangen sein.

Aber auch zwischen Klasse I- sowie Klasse II- und Kern-mRNA-Spleißen gibt es Übereinstimmung. Beide Mechanismen umfassen

diesselben Reaktionsschritte, wobei die Anzahl der Phosphodiesterbrücken, die gespalten bzw. ligiert werden, ausgeglichen ist. Auch die Exzision von Introns in der Lariatform scheint nicht nur auf Klasse II/mRNA-Introns beschränkt zu sein. Das Intron in der mitochondrialen 21S-rRNA bei Hefe, der Klasse I zugehörend, wird als Lariat exzidiert (Arnberg, 1986).

4. Themenstellung

Bei Beginn dieser Arbeit war erstmals das "Selfsplicing" eines Introns (bei Tetrahymena) beschrieben worden. Die weitreichende Bedeutung dieses Prinzips für die Exzision anderer Introns war nicht bekannt; ein autokatalytisches Spleißen von Organell-Introns wurde noch nicht diskutiert. Die bekannten Mutationen, die das Spleißen von Organell-Introns beeinträchtigen und teils in den ORFs dieser Introns, teils im Kern lokalisiert worden waren, ließen vielmehr eine Beteiligung von Proteinen mit enzymatischer Aktivität (Endonukleasen, Ligasen) als wahrscheinlich gelten.

Die Intron-Sekundärstrukturen, die durch den Sequenzvergleich verschiedener Introns etabliert worden waren, existierten als Modell. An Klasse I-Introns wurden von verschiedenen Gruppen Ansätze unternommen, die biologische Bedeutung dieser Strukturen zu bestätigen.

Zu diesem Zeitpunkt schien es lohnenswert:

1. Die Bedeutung der Sekundärstruktur von Klasse II-Introns durch experimentelle Daten zu belegen;
2. Die Rolle von Proteinen beim Spleißprozeß zu untersuchen; vor allem sollte der Beitrag und die Funktion von Kernproteinen aufgeklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Aspekte am Beispiel von bI1, einem Vertreter der Klasse II-Introns, bearbeitet. Für Untersuchungen über den Einfluß von Kernproteinen schien bI1 gut geeignet, da dieses Intron in rho⁻-Stämmen, denen ein mt Translationssystem fehlt, exzisiert wird. Enzyme, die am Spleißen beteiligt sind, sollten notwendigerweise im Kern lokalisiert sein.

Die jüngste Entdeckung, daß das untersuchte Klasse II-Intron in vitro eine autokatalytische Spleißaktivität besitzt, läßt die Suche nach beteiligten Kernfaktoren keineswegs überflüssig erscheinen. Es ist nicht nur vorstellbar, daß die Reaktionsbedingungen in vitro von den in vivo-Verhältnissen verschieden sind, sondern auch, daß Proteine die autokatalytische Reaktion um ein Vielfaches beschleunigen, oder daß Regulationsprozesse, die auf der Ebene des Intronspleißens stattfinden, von Kernproteinen gesteuert werden. Ein erster Hinweis in dieser Richtung wurde mit der Identifikation einer Kernmutante (pet⁻) von Garriga und Lambowitz (1984) gegeben, welche das Spleißen eines Introns verhindert, das in vitro zum "Selfsplicing" befähigt ist.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAP	Chloramphenicol
CHX	Cycloheximid
ci	Curie
DMF	Dimethylformamid
dA(C,C,U)TP	Desoxy-Adenosin-(Guanin-,Cytosin-,Uridin-) Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cytDNA	cytoplasmatische DNA
mtDNA	mitochondriale DNA
E	Exon
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IVS	Intervenierende Sequenz
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
MMS	Methylmethansulfonat
O.D.	optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
cytRNA	cytoplasmatische RNA
mtRNA	mitochondriale RNA
mRNA	Boten-RNA "(messenger" RNA)
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
rpm	Umdrehungen/min
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
S	Svedberg-Einheit
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	"unit"
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β D-Galaktosid
WT	Wildtyp

2. Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit Michigan, USA
Agarose	Seakem, Maine, USA
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bisbenzimid	Riedel de Haen, Hannover
BSA	Behring, Marburg
Caesiumchlorid	Baker, Deventer, Holland
CAP	Bayer, Leverkusen
DMS	Buka, Fluchs, Schweiz
DNA(Kalbsthymus)	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, St. Louis
EB	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Glyoxal	Ega-Chemie, Steinheim
Hefeextrakt	Difco, Detroit
Hybridisierungsprimer M13	Boehringer, Mannheim
IPTG	Boehringer, Mannheim
Polyethylenglykol	Serva, Heidelberg
Primer für Sequenzierung	Boehringer, Mannheim
SDS	BHD LTD., Poole, England
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, St. Louis
X-Gal	Boehringer, Mannheim

3. Enzyme

Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim Biolabs, Beverly USA Bethesda, Rockville Maryland, USA
DNA-Polymerase ("Klenow"-P.)	Boehringer, Mannheim New England Nuclear, Dreieich, BRD
DNA-Polymerase I	Boehringer, Mannheim
DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim New England Nuclear, Dreieich, BRD
Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
Phosphatase, alkalische	Boehringer, Mannheim
andere:	
Proteinase K	E. Merck
Lysozym	Sigma, St. Louis, USA
Zymolase	Kirin Brewery Ltd., Japan

4. Radiochemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig
New England, Nuclear, Dreieich

5. Sonstiges

Röntgenfilm	Kodak und Dupont
Röntgen-Verstärkerfolie	CAWO, Schrobenuhausen
Nitrozellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
3MM-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel

6. Genetische Bezeichnungen und Abkürzungen

ρ^+mit^+	mt WT-Genom;
ρ^+mit^-	Punktmutation oder kurze Deletion der mt DNA, die zur Atmungsdefizienz führt;
ρ^-	Makrodeletion (10-99,9% des Genoms) der mt DNA, die zur Atmungsdefizienz und zum Verlust des mt Translationssystems führt;
ρ^0	Verlust der mt DNA;
a/α	Paarungstypen;
opl	Kernmutation (Kovacova et al., 1968); führt 1. zur Atmungsdefizienz; 2. zur Letalität von ρ^- -Mutanten;
$kar1$	Kernmutation (Conde und Fink, 1976; Lancashire et al., 1979): Defekt der Kernverschmelzung, so daß Haploide beider Paarungstypen nach der Zytogamie entstehen;
SUP^-/sup^+	Allele, die das Vorhandensein/Fehlen einer Suppressor-mutation anzeigen;
cs/hs	kältesensibel/hitzesensibel;
ts	temperatursensibel;
rc/rd	atmungskompetent/atmungsdefekt;

7. Stämme

Stämme von *S. cerevisiae*:

Stamm	Kerngenotyp	mt Genotyp	Referenz
777-3A	α , <i>adel</i> , <i>op1</i>	$\rho^+ \text{mit}^+/-$	Kovacova et al., 1968
IC8/AA1	<i>a</i> , <i>leu1</i> , <i>kar1</i>	$\rho^+ \text{mit}^+/-/\rho^+$	Conde und Fink, 1976
IC11/AA2	α , <i>his</i> ⁻ , <i>kar1</i>	$\rho^+ \text{mit}^+/-/\rho^+$	Lancashire et al., 1979
AH215	<i>a</i> , <i>leu2-3</i> , <i>leu2-112</i> , <i>his3-11</i> , <i>his3-115</i> , <i>can</i> ^a	$\rho^+ \text{mit}^+$	A. Hinnen (Basel)
AH216	<i>a</i> , <i>leu2-3</i> , <i>leu2-112</i> , <i>his3-11</i> , <i>his3-15</i> , <i>phoE</i> , <i>phoC</i>	$\rho^+ \text{mit}^+$	A. Hinnen (Basel)

cob⁻-Mutanten mit dem Paarungstyp α sind abgeleitet vom Stamm 777-3A (Bechmann et al., 1981; Kotylak et al., 1976; Schweyen et al., 1977);

cob⁻-Mutanten mit dem Paarungstyp *a* wurden aus *kar*-Kreuzungen der entsprechenden α , *cob*⁻-Stämme mit dem Stamm IC8/AA1, ρ^+ erhalten (nach der Methode von Lancashire und Mattoon, 1979);

E. coli-Stämme:

490 *recA*⁻ / SF8 *recA*⁺: Empfängerstämme bei Transformationen mit
pBR 322;

JM101/BMH1/1: Empfängerstämme bei Transformationen mit
M13-Vektoren;

8. Medien und Puffer

YD 1% Yeast-Extrakt; 3% Glucose;

YG 1% Yeast-Extrakt; 3% Glycerin;

YDG wie YG, jedoch zusätzlich 0,1% Glucose;

W/O Minimalmedium; 0,7% Yeast Nitrogen Base; 3% Glucose;

YGal 3% Yeast-Extrakt; 5% Galaktose;

Für die Herstellung von Platten wurde dem jeweiligen Medium 2% Agar zugesetzt; im Fall von W/O-Medium wurde Difco-Agar verwendet;

LB 1% Trypton; 0,5% Yeast-Extrakt; 1% NaCl; pH auf 7,5 einstellen;

Für Antibiotikaplatten wurden 120µg/ml Tetracyclin bzw. 150µg/ml Ampicillin zugegeben;

20xSSC 3M NaCl; 0,3M Natriumcitrat;

20xDenhardt's 0,4% BSA; 0,4% Ficoll; 0,4% PVP;

Sorbitolpuffer 10mM Tris-HCl, pH 6,8; 2mM EDTA; 0,6M oder 1,5M Sorbitol;

TE 10mM Tris; 2mM EDTA;

10xTEB(pH 8,3) 89mM Tris; 2,5mM EDTA; 89mM Borsäure;

10xM9-Salze pro Liter: 150g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
75g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
30g KH_2PO_4
5g NaCl
10g NH_4Cl ;

M9-Platten 1,5% Agar; 10% M9-Salze; 0,2% Glucose;
1% Mg_2SO_4 (0,1M); 0,1% Thiamin (10mg/ml);

9. Methoden

9.1 Induktion und Isolierung von Revertanten

9.1.1 Manganchloridbehandlung

Zu Flüssigkeitskulturen der entsprechenden mit⁻-Mutanten (Titer 10⁶ Zellen/ml) wurde MnCl₂ in einer Endkonzentration von 0,5mg/ml zugegeben. Nach Aufteilung in Mikrotiterplatten wurden die Zellen bis zur frühen stationären Phase gezüchtet und anschließend auf YG-Platten überstempelt (Putrament et al., 1973).

9.1.2 MMS-Behandlung

Zellen von mit⁻-Mutanten wurden bis zur späten logarithmischen Phase (1x10⁶ Zellen/ml) vorgezüchtet, in 0,1 M Phosphatpuffer suspendiert und mit einer 10%-igen MMS-Lösung versetzt, so daß die Endkonzentration von MMS 0,5% betrug. Nach einer Inkubation im Wasserbad bei 30°C (30 min) und mehrmaligem Waschen erfolgte die Plattierung der unverdünnten Suspension (in YD) auf Glycerinmedium.

9.2 EB-Mutagenese zur Induktion von rho⁺-Stämmen

Kulturen mit einem Titer von 10⁶ Zellen/ml wurden in YD-Vollmedium mit einer EB-Konzentration von 0,5mg/ml in der Mikrotiterplatte bei 30°C bis zur frühen stationären Phase gehalten, drei bis vier Mal sukzessiv in neue Mikrotiterplatten mit frischem, EB-haltigem Medium überstempelt und erneut hochgezüchtet. Alternativ ließen sich rho⁺-Stämme durch 3-4-maliges Überstempeln auf EB-haltige YD-Platten (40µg EB/ml) heranziehen (Groudinsky et al., 1981).

9.3 Umkreuzung von mit⁻-Mutanten mit den Kernfusionsmutanten IC8/AA1 bzw. IC11/AA2

Mit Hilfe des kar1-1-Markers der Stämme IC8/AA1 bzw. IC11/AA2 erfolgte die Cytoduktion nach der von Lancashire und Mattoon (1979) beschriebenen Methode.

9.4 Rekombinationskreuzung

Die zu kreuzenden Stämme wurden auf einer Vollmediumplatte in gleichem Verhältnis zusammengetropft. Nach 6 Stunden erfolgte das Abwaschen der Zellen und die Überführung in flüssiges W/O-Medium mit 5% Glucose. Im Verlauf der nächsten 3-4 Tage wurden die Kulturen ein bis zwei Mal verdünnt und danach Einzelkolonien auf W/O-Platten ausgestrichen. Wenn diese nach zwei bis drei Tagen hochgewachsen waren, konnte das Koloniemuster mit einem Samtstempel auf eine YG-Platte übertragen werden. Nach dem Bebrüten dieser YG-Platten, ließ sich durch den Vergleich von W/O- und YG-Platten feststellen, ob atungsdefekte Rekombinanten entstanden waren.

9.5 Tetradenanalyse

Diploide Zellen wurden bis zur stationären Phase vorgezüchtet, gewaschen und auf Acetatagar ausgetropft. In der Regel ist nach drei bis vier Tagen das Auftreten von Asci bei der mikroskopischen Kontrolle zu beobachten. Zur Analyse der Tetraden wurden diese in 1ml H₂O suspendiert und 20 bis 30 min mit 40µl Glusulase bei 30°C inkubiert. Von der Suspension wurde ein Tropfen auf eine YD-Platte gegeben und ausgestrichen. Die vier Sporen eines Askus konnten mit Hilfe des Mikromanipulators getrennt und auf der Agarplatte verteilt werden.

9.6 Anzucht von Hefe- und Bakterienkulturen

9.6.1 Anzucht von Hefekulturen zur Isolation mt DNA

Zur Gewinnung von mt DNA wurden Hefezellen 15 Stunden in YD-Medium bis zur frühen stationären Phase (1×10^8 Zellen/ml) unter Rühren bei 30°C hochgezogen.

9.6.2 Anzucht von Hefekulturen zur Isolation von RNA

Für die Isolierung von RNA wurden die Hefezellen in YGal mit 0,3% Glucose bis zur späten logarithmischen Phase unter starkem Rühren gezüchtet und ca. 2 Stunden vor dem Ernten durch die Zugabe des gleichen Volumens YGal reaktiviert. Die Verwendung von Galaktose anstelle von Glucose verhindert den Effekt der Katabolitrepression durch Glucose (Magasanik, 1961).

9.6.3 Anzucht von Hefekulturen für die Transformation

100ml YPD-Medium wurden mit einer stationären Vorkultur des Empfängerstammes beimpft, wobei vier verschiedene Verdünnungen angesetzt wurden (zwischen 4×10^{-3} und 4×10^{-4}). Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht bis die O.D.₆₀₀ der Kultur zwischen 1 und 1,5 lag. Zur Messung der O.D. wurde die Hefekultur 1:30 mit H₂O verdünnt.

9.6.4 Anzucht von E. coli-Zellen zur Isolierung von Plasmid-DNA

Als Vorkultur dienten 50ml LB-Medium (+50µg/ml Ampicillin), das mit einer Bakterien-Einzelkolonie angeimpft und 12 Stunden bei 37°C geschüttelt worden war. Mit dieser Vorkultur wurden 1-2l LB-Medium (+Ampicillin) versetzt und bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 unter Schütteln hochgezogen. Der Zusatz von Chloramphenicol (zur Endkonzentration von 170µg/ml) führte innerhalb von

weiteren 15 Stunden zur Amplifikation der Plasmid-DNA.

9.6.5 Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Transformation

1ml einer Übernachtskultur wurde mit frischem LB-Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 (ca. 5×10^7 Zellen) weiterinkubiert; dies nahm ca. 3-5 Stunden in Anspruch.

9.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefe- und Bakterienkulturen

9.7.1 Isolierung von mt DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung mt DNA wurde nach der Methode von Lang et al. (1977) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Die Zellen wurden in Sorbitolpuffer mit Hilfe von Glasperlen bis zu einer Ausbeute von 60-80% aufgeschlossen. Bei einem Teil der Hefestämme erfolgte die Protoplastierung der Zellen enzymatisch mit Zymolase (Lewin et al., 1978). Durch eine differenzielle Zentrifugation ließen sich die Mitochondrien nach einigen Waschschritten bei 20000rpm pelletieren. Nach der Lyse der Mitochondrien mit SDS (Endkonzentration ca. 2%) und der Behandlung mit Proteinase K (10 µg/ml) wurde NaCl bis zur Endkonzentration von 1M zugegeben und nach zwei Stunden das Präzipitat (v.a. Proteine) bei 15000rpm abzentrifugiert. Die Entfernung von RNA und Kern-DNA ließ sich durch die CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (CsCl-Lösung von 1,2g/cm³ und 1µg/ml Bisbenzimid; Grosch, 1980) erreichen (1-2Tage bei 40000rpm und 20°C). Die mt DNA-Bande wurde mit einer Spritze entnommen, 1:1 mit TE verdünnt und mit 2-fachem Volumen Ethanol bei RT gefällt. Das erhaltene Pellet wurde dann in TE resuspendiert und erneut mit Ethanol und 0,3M Ammoniumacetat gefällt.

9.7.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

200ml stationäre Kultur wurden in YD-Medium aufgenommen und 1-3 Stunden reaktiviert, so daß ca. 80% der Zellen Knospen hatten. Die Hefezellen wurden in ca. 10-15ml Präparationspuffer (1M Sorbitol / 20mM EDTA / 50mM Citratphosphat) suspendiert und durch die Zugabe von Zymolase (3mg/g Zellnaßgewicht), sowie 0,5% Mercaptoethanol protoplastiert. Nachdem 70-100% Protoplasten entstanden waren (nach ca. 1-2,5 Stunden), erfolgte die Suspendierung der Zellen in 10ml Präparationspuffer und die Zugabe von SLS zur Endkonzentration von 1%. Nach drei Phenolextraktionen ließ sich die DNA mit Isopropanol und Ammoniumacetat ausfällen, und durch die darauffolgende CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation weiter reinigen.

9.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

9.7.3.1 Präparative Methode

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Präparationsmethode nach Birnboim und Doly (1979) bzw. nach Clewell (1972) angewendet, wobei die Zellen mit Lysozym angedaut und mit SDS lysiert wurden. Die Plasmid-DNA ließ sich durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation reinigen, die DNA durch den Zusatz von EB (10mg/ml) sichtbar machen.

9.7.3.2 Schnelle Plasmidpräparation (Minipräp.) aus *E. coli*

Die Minipräparation der Plasmid-DNA erfolgte nach der von Maniatis et al. (1982) modifizierten, alkalischen Lysis-Methode nach Birnboim und Doly (1979).

9.7.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Die von Struhl et al. (1979) bzw. Nasmyth und Reed (1980) beschriebene schnelle Präparationsmethode ist geeignet, um *E. coli* mit der reisolierten Plasmid-DNA aus Hefe zu transformieren; für Restriktionen ist diese Methode jedoch nicht zu verwenden. Die Zellen werden mit Zymolase behandelt und in einer alkalischen SDS-Lösung lysiert. Nach Entfernung der denaturierten chromosomalen DNA und der Proteine wird die Plasmid-DNA (mit mehr als 95% RNA) gefällt.

9.7.5 Isolierung von RNA aus Hefetransformaten

Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur in YGal-Medium wurden geerntet und zwei Mal mit eisgekühlter 10mM-Tris (pH 8,0)-Lösung, der 150µg/ml CHX zugesetzt war, gewaschen. Nach Suspension der Zellen in 50mM Tris(pH 8,0) / 10mM EDTA ließen sich die Zellen nach Zugabe von gleichen Mengen an Glasperlen und Phenol (80%) mit Hilfe des Vortexschüttlers (1min) aufbrechen. SDS wurde in einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben und die Zellen erneut 1 min lang geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 8000rpm wurde der Überstand mit 1/14 Volumen Na-Acetat (3M) und 1/14 Volumen SDS (10%) versetzt und drei Mal mit Phenol extrahiert. Durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol (100%) zur wässrigen Phase wurde die DNA präzipitiert (Methode modifiziert nach Guarente und Mason, 1983).

9.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch die Messung der Absorption bei 260nm bestimmt (1 O.D.=50µg/ml DNA). Die Reinheit wurde aus dem

Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280nm abgeschätzt (reine DNA: 1,8-2,0).

9.9 Restriktion und Gelelektrophorese von DNA

Der Restriktionsendonukleaseverdau der DNA wurde nach den Vorschriften der Enzymhersteller durchgeführt (DNA-Konzentration 0,1-1µg DNA/10µl Ansatz). Der Reaktionsstop erfolgte durch Zusatz von 1/3 Volumen Auftragspuffer (10mM Tris-Cl, pH 7,4 / 10mM EDTA/ 0,7% Bromphenolblau). Die Auftrennung der Restriktionsfragmente ließ sich durch horizontale 0,6-1,5%-ige Agarosegele erreichen (Grosch et al., 1980).

9.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose- bzw. Acrylamidgelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten wurde nach der von Maniatis et al. (1982) beschriebenen Methode durchgeführt.

9.11 Radioaktive Markierung von DNA

9.11.1 Nicktranslation

Die Markierung der DNA mit ^{32}P -ATP und DNA-Polymerase I erfolgte nach der Methode von Rigby et al. (1977), jedoch ohne den Zusatz von DNAase. Die ^{32}P -markierte DNA wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol und Ammoniumacetat (2,5M Endkonzentration) 10 min bei RT gefällt, wobei nicht eingebaute Triphosphate in Lösung bleiben. Die DNA ließ sich nach Zentrifugation bei 15000rpm gewinnen. Anschließend wurde sie mit 70%-igem Ethanol gewaschen und Vakuumgetrocknet.

9.11.2 3'-Endmarkierung

Zur 3'-Endmarkierung zurückgesetzter Enden von ds-DNA wurde das

Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase entsprechend der Vorschriften von Maniatis et al. (1982) verwendet.

9.11.3 5'-Endmarkierung

Nach der Dephosphorylierung der terminalen 5'-Phosphate mit alkalischer Phosphatase wurden die vorstehenden 5'-Hydroxylgruppen mit Polynukleotidkinase und ^{32}P -ATP phosphoryliert (Maniatis et al., 1982).

9.12 Southern-Analyse von DNA

Der Transfer von DNA auf Nitrocellulose sowie die Hybridisierung der gebundenen DNA mit ^{32}P -markierter DNA erfolgte nach der von Southern (1975) publizierten Methode.

9.13 Northern-Analyse

Die Northern-Analyse von glyoxylierter RNA wurde nach der Methode von Thomas (1981) durchgeführt. Die S-Werte der Transkripte bzw. der entsprechenden Größen in b konnten durch den Vergleich mit der 18S-(2000 Nukleotide) und 28S-(5000 Nukleotide)rRNA ermittelt werden.

9.14 Dehybridisierung

Die Dehybridisierung von Southern- und Northern-"Blots" erfolgte durch 10-minütiges Kochen der Nitrocellulosefilter in H_2O (dest) und die anschließende Kontrolle der Dehybridisierung durch Autoradiographie.

9.15 Dephosphorylierung

Die Entfernung der 5'-terminalen Phosphatreste wurde nach den Angaben von Maniatis et al. (1982) durchgeführt.

9.16 Ligation von Fragmenten mit den Vektoren pBR 322, YEpl3, M13

Die Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert und, soweit erforderlich, über Agarosegele gereinigt und dephosphoryliert. Die zu klonierenden Fragmente wurden mit dem Vektor in 1xLigasepuffer (66mM Tris pH7,6 / 6,6mM MgCl₂ / 10mM DTT / 0,4mM ATP) unter Zugabe von 0,5-2u T4-Ligase bei 14°C bzw. RT ("blunt-end"-Ligation), inkubiert. Die Endkonzentration der DNA im Inkubationsansatz betrug 20µg/µl.

9.17 Transformation von E. coli-Stamm SF 8(recA⁺) bzw. 490 (recA⁻)

Die Transformation von E. coli erfolgte nach der in Maniatis et al. (1982) beschriebenen Transformationsmethode nach CaCl₂-Behandlung. Als Empfängerstamm diente E. coli (490 recA⁻) bzw. SF8 (recA⁺).

9.18 Transformation von JM101 bzw. BMH1/1 mit M13

Die Methode ist von Messing et al. (1983) beschrieben, wobei die Zellen nach 40-minütiger Inkubation mit dem Ligationsansatz in 3ml Topagar (45°C) mit 20µl IPTG (20mg/ml in H₂O) und 20µl 2%-igem X-Gal (in DMF) gegeben und auf LB-Platten gegossen werden. Nach ca. 12 Stunden ließen sich blaue (kein Insert) und weiße (mit Insert) Plaques unterscheiden.

9.19 Transformation von Hefe

Die Hefetransformation erfolgte nach der Sphäroplastenmethode, die von Hinnen et al. (1978) und Beggs (1978) beschrieben ist. Da die Sphäroplasten fragil und osmotisch instabil sind, müssen alle Lösungen ca. 1M Sorbitol zur osmotischen Stabilisierung enthalten

und zudem Zentrifugationen bei höherer Geschwindigkeit bzw. starkes Schütteln vermieden werden.

Nach Zugabe von DTT in einer Endkonzentration von 50mM und 30-minütiger Inkubation ließ sich die Sphäroplastierung durch Addition von 100µl Glusulase erreichen (300ml Zellen als Ansatz verwendet); durch die Bestimmung der O.D.₆₀₀ wurde die Sphäroplastierung verfolgt.

Ca. 45-60 min. nach Glusulasezugabe betrug die gemessene O.D. nur noch 20-30% des Ausgangswertes und die enzymatische Reaktion wurde beendet. Nach zwei Waschschritten mit 1M-Sorbitol erfolgte die Regeneration der Zellen in YPDS (1% Yeast / 2%Pepton / 2%Dextrose / 1M Sorbitol)-Medium bei 30°C (1 Stunde). Für die DNA-Aufnahme ist CaCl_2 sowie PEG erforderlich. Die Zellen werden in 1M Sorbitol / 10mM Tris-Cl (pH 7,5) / 10mM CaCl_2 suspendiert, anschließend je 100µl Sphäroplasten mit 1-10µg DNA versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1ml einer Lösung von 20%PEG / 10mM CaCl_2 / 10mMTris-Cl pH7,5 und 5-minütiger Inkubation wurden die Zellen in Sorbitol aufgenommen und in Regenerationsagar, der mit 1M Sorbitol substituiert war, eingebettet (50°C). Der Regenerationsagar enthielt alle notwendigen Nährstoffe bis auf den zu komplementierenden AS-Marker. Nach 3-5 Tagen wuchsen alle regenerierfähigen Sphäroplasten, die Plasmid-DNA enthielten, zu Kolonien heran.

9.20 DNA-Sequenzanalyse

9.20.1 Methode nach Maxam-Gilbert

Die endmarkierten DNA-Fragmente wurden den chemischen Sequenzreaktionen, wie von Maxam und Gilbert (1980) beschrieben, unter-

worfen. Die Reaktionsprodukte wurden in je 1 μ l Auftragspuffer (80% Formamid (deion.) / 50mM Tris-Borat / 1mM EDTA / 0,1M Xylen-cyanol / 0.1% Bromphenolblau) gelöst, denaturiert und auf 8- bzw. 20%-igen Acrylamidgelen (600x200x0,3mm) aufgetrennt.

9.20.2 Dideoxymethode nach Sanger

9.20.2.1 Präparation von "template"-DNA

Zur Isolierung der einzelsträngigen Phagen-DNA wurde eine Übernachtkultur von JM 101 1:100 in 2ml frischem LB-Medium verdünnt und mit M13-infizierten Zellen (weiße Plaques) angeimpft. Nach 8-12-stündiger Inkubation bei 37°C unter heftigem Schütteln wurden die Zellen bei 12000g abzentrifugiert. Die Phagen im Überstand konnten durch die Zugabe von PEG 6000 und NaCl gefällt und pelletiert werden. Nach der Suspendierung des Pellets und einer anschließenden Phenolextraktion wurde die Phagen-DNA mit Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Als Ausbeute ließen sich ca. 10 μ g DNA/2ml Kultur erhalten (Messing et al., 1983).

9.20.2.2 Hybridisierung von Primer-DNA an das "template" ("Annealing")

Etwa 1 μ g der einzelsträngigen Phagen-DNA wurde mit ca. 2.5ng Primer (Oligonukleotid, 15-mer) im molaren Verhältnis 1:1 in geeignetem Puffer aufgenommen, mit Paraffin überschichtet, und auf 80°C erhitzt. Der Ansatz wurde anschließend über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden langsam abgekühlt (Messing et al., 1983).

9.20.2.3 Sequenzierungsreaktionen und Sequenzgellauf

Die Sequenzierungsreaktionen erfolgten nach dem Protokoll von Sanger et al. (1977). Je 2 μ l des "Annealinggemisches", des

dNTP/ddNTP-Gemisches und einer Lösung von ^{32}P -dATP (1 μCi /Sequenzreaktion) wurden zusammenpipettiert und nach Zugabe von DNA-Polymerase (Klenow-Fragment; ca. 0,5u/Sequenzreaktion) 20 min bei 30°C inkubiert. Nach Addition eines Überschusses aller vier dNTPs ("Chase") und der Inkubation für weitere 15 min (bei RT) wurde die Reaktion mit Stop-Mix (Formamid mit gelöstem Farbstoff) beendet. Die Denaturierung der Proben ließ sich durch 2-minütiges Erhitzen auf 100°C erreichen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 50cm langen, 0,3mm dicken, harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen, wobei die Platten so vorbehandelt waren, daß das Gel auf einer Seite kovalent gebunden wurde (Ansorge et al., 1980). Nach dem Sequenzgellauf wurden die Gele in 10%-iger Essigsäure fixiert, mit vollentsalztem H_2O gewaschen und getrocknet.

III. ERGEBNISSE

1. Mutationen in der bII-Sequenz

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Mutationen in einem der Klasse II-Introns von *S. cerevisiae*, dem 765 bp langen bII des COB-Gens. Durch Northern-Analysen war für drei *cis*-aktive bII-Mutanten, M1301, M4873 und G5049, die Auswirkung auf das Spleißen *in vivo* bereits ausreichend nachgewiesen worden (Schmelzer et al., 1981; 1982). Die Positionen dieser Mutationen in bII sind in Abb.4 wiedergegeben. Charakteristisch für alle bII-Mutationen ist die Anreicherung eines Transkriptes von 8000 bp, welches bII und alle anderen Intronsequenzen besitzt (Schmelzer, 1981). Daneben treten - stammbabhängig - auch kleinere Transkripte auf, von denen bekannt ist, daß diese das Intron bII noch enthalten, nicht aber eines oder mehrere der anderen Introns. Das exzisierte COB-Intron 1 ist als 10S-RNA in circularärer Form nachweisbar (Arnberg et al., 1980; Halbreich et al., 1980). Die Exzision von bII ist bei den Stämmen G5049 und M1301 vollständig blockiert; dagegen zeigt die Mutante M4873, welche einen temperaturabhängigen Phänotyp besitzt (hs), eine weniger ausgeprägte Inhibition (Bechmann et al., 1981; Schmelzer et al., 1981).



Abb.4: Lage der *cis*-aktiven Mutationen G5049, M4873 und M1301 im Intron bII von COB. Die Pfeile geben die Positionen der Mutationen an; dunkle Balken kennzeichnen Exons, offene Balken Introns, punktierte Balken ORFs innerhalb von Introns.

Da bI1 nicht selbst für ein Protein kodiert und seine Exzision auch von keinem anderen in den Mitochondrien synthetisierten Protein abhängig ist, betreffen alle die bI1-Exzision blockierenden Mutationen entweder ein Spleißsignal dieses Introns (cob⁻-Mutationen) oder Kerngene (pet⁻), welche Komponenten für das Spleißen kodieren. Mutationen des erstgenannten Typs sind seit langem bekannt (Kotylak et al., 1976; Schweyen et al., 1977), Mutationen des zweiten Typs werden in Kapitel 2.3 als Suppressoren von cob⁻-Mutanten beschrieben (SUP⁻-Mutationen).

Die Nukleotidsequenz von Intron 1 von COB wurde von Lazowska et al. (1980, 1983) und Schmelzer et al. (1983) bestimmt. Durch den Vergleich verwandter Organellintronsequenzen konnte ein Sekundärstrukturmodell etabliert werden. In Abb.5 ist die postulierte Sekundärstruktur wiedergegeben, welche in Anlehnung an bereits vorhandene Klasse II-Sekundärstrukturmodelle unter besonderer Berücksichtigung von konservierten Sequenzen innerhalb von bI1 und aI5c erstellt wurde (Schmelzer et al., 1983).

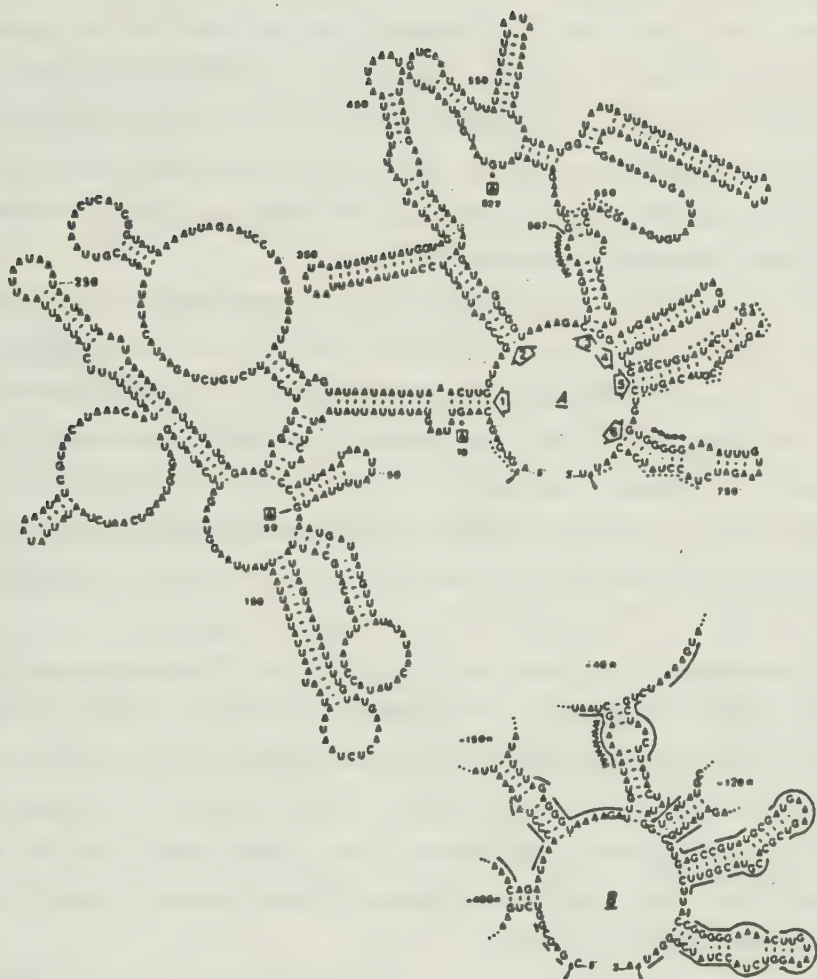


Abb.5: A: Sekundärstrukturmodell der bI1-RNA; die Pfeile kennzeichnen die 5'- bzw. 3'-Spleißstellen. Die Positionen der identifizierten Mutationen sind gekennzeichnet: G5049 (Pos. 10, 59, 522 □); M1301 (Pos. 503-507 △△); M4873 (Pos. 735-739 *). Die Stämme der "core"-Struktur sind mit 1-6 numeriert.

B: "core"-Strukturmodell von aI5c.

Konservierte Sequenzen (...) von Klasse II-Introns finden sich am 5'- und 3'-Spleißpunkt, in einem 14b-"Hairpin" (bI1: "Stem"5), in einer 8b langen Sequenz (Pos. 504-505 und 648-653) und um den "Branchpoint" (Pos. 756-762).

Die Abbildung ist entnommen aus Schmelzer et al., 1983;

Die postulierte "core"-Struktur von Klasse II-Introns besteht aus einem zentralen Ring von insgesamt ca. 30 Nukleotiden und 6 typischen Stammstrukturen. Sequenzen am 5'-Spleißpunkt und in einigen Bereichen von Stamm 2 und 5 sind in allen Klasse II-Introns konserviert. Stärker ist die Konservierung von Primärsequenzen zwischen bII und aI5c; sie erstreckt sich über die gesamte "core"-Struktur (vgl. Abb.5).

Bestimmte Bereiche innerhalb des vorliegenden Sekundärstrukturmodells erhielten durch die Analyse von Mutanten ihre Bestätigung (siehe Abb.5). M4873 erwies sich als Deletion eines Basenpaares in einer Serie von 5 G, 30-34 bp aufwärts vom 3'-Spleißpunkt. Die Mutation reduziert die Stabilität des betroffenen Stammes nicht wesentlich, aber sie vergrößert eine "Loop"-Struktur, welche in bII und aI5c, wie auch in anderen Klasse II-Introns konserviert ist.

Die Sequenzanalyse von G5049 ermittelte drei Positionen mit G→A-Transitionen, wobei durch rho⁻-Deletionskartierung gezeigt werden konnte, daß nur zwei dieser Mutationen funktionell bedeutend sind (Schmelzer et al., 1983). Diese liegen 10 bzw. 59 bp vom 5'-Spleißpunkt entfernt. Die Mutation am 5'-Ende (Position 10) vermindert die Stabilität einer hybriden Stammstruktur; dadurch wird die proximale Helix instabil.

M1301 stellt, wie M4873, eine -1bp-Deletion dar. Die Mutation liegt 211-215 bp vom 3'-Spleißpunkt entfernt und besteht in einer Deletion von 1A in einer Serie von 5A. Interessanterweise ist dieser Bereich Teil einer größeren konservierten Sequenz in bII und aI5c, welche im Sekundärstrukturmodell von bII an der Bildung einer Hybridstruktur, sowie einer internen, ungepaarten Schleif-

fenstruktur beteiligt ist. Diese stark konservierte Primärsequenz lautet:

5'-GGGTAAAAGACTATTGAAAAACCTAA-3' in bI1

***** * * *****

5'-GGGTAAAAGATTGTATAAAAAGCTAA-3' in aI5c

Da die -1bp-Deletion von M1301 die Hybridstruktur nicht destabilisiert, sondern die Größe der internen Schleife sowie die Länge des in bI1 und aI5c konservierten Dekanukleotids reduziert, scheint, wie bei M4873, der ungepaarten Region eine Bedeutung zuzukommen.

Die erwähnten bI1-Mutationen betreffen also Stammstrukturen der zentralen "core"-Struktur. M4873 und M1301 verändern sowohl die konservierte Primär- als auch die konservierte Sekundärstruktur. Die Entdeckung von Mutationen in ungepaarten Bereichen, welche die Stabilität einer Hybridstruktur nicht vermindern, war neu; frühere Arbeiten beschrieben zumeist Mutationen in intramolekularen Hybridstrukturen (Anziano et al., 1982; De la Salle et al., 1982; Weiss-Brummer et al., 1983; Holl et al., 1985). Da bI1 kein Protein kodiert wie die postulierten Translationsprodukte ("RNA-Maturasen") anderer Introns, war es vorstellbar, daß Kernproteine eine entsprechende Funktion übernehmen könnten und mit solchen ungepaarten Strukturen interagieren würden.

2. Revertanten zu bI1-Mutanten

Zur Bestätigung, daß die durch Mutationen (M1301, M4873, G5049) gekennzeichneten Sequenzen und Strukturen in vivo relevant sind, sollte die Untersuchung von Revertanten dienen, welche die Kapazität, die Introns exakt zu exzistieren, wiedererlangt hatten. Insbesondere sollten dadurch die RNA-Sekundärstrukturmodelle, die

auf der Grundlage von konservierten Primärsequenzen und Heteroduplexstrukturen durch Computeranalyse erstellt worden waren, überprüft werden (vgl. Abb.5).

Zum zweiten wurden Revertanten gesucht, welche eine im Kern kodierte Suppressormutation tragen. Solche Suppressormutationen bieten die Möglichkeit, Kerngene zu identifizieren, die am Intranspleißen beteiligt sind.

2.1 Isolierung von Revertanten

Die Induktion von Revertanten erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, durch $MnCl_2$ - bzw. MMS-Mutagenese. $MnCl_2$ verursacht bevorzugt Mutationen im mt Genom (mit- und rho-Mutationen; Putrament et al., 1973), wogegen nach MMS-Behandlung auch Kernmutationen entstehen (Strauss, 1971). Die Revertanten lassen sich durch Anzucht auf nicht fermentierbarem Substrat (Glycerin) selektieren. Spontane Revertanten treten mit einer Rate von 10^{-7} auf; nach Behandlung mit Mutagenen erhöht sich dieser Faktor beträchtlich. Während M1301 sowie M4873, revertieren, konnten für den Stamm G5049, entsprechend seiner Doppelmutation, keine Revertanten isoliert werden. Die meisten Revertanten wuchsen auf nicht vergärbarem Medium wie der WT; einige zeigten ein temperaturabhängiges Wachstum auf Glycerin nach einer Inkubation bei 23°C, 30°C und 36°C. Durch nachfolgende genetische Tests, die Rekombinationsanalyse sowie die Untersuchung von rho-Klonen, wurde festgestellt, ob die Temperatursensitivität mit der Suppressormutation gekoppelt war.

Als Ergebnis der Mutagenese standen für den Stamm M1301 500

Revertanten zur Verfügung; es sind drei verschiedene Typen zu erwarten:

- a) Echte Rückmutationen zum WT;
- b) Pseudo-WT-Revertanten, bedingt durch sekundäre Veränderungen in der mt DNA;
- c) Revertanten mit kernkodierten Suppressormutationen.

2.2 Genetische Charakterisierung von Revertanten

2.2.1 Bestimmung des Vererbungsmodus

Zur Bestimmung der genetischen Eigenschaften der Suppressormutation wurde zu jeder Revertante durch EB-Mutagenese, welche zum Verlust des mt Genoms führt (Slonimski et al., 1968; Deutsch et al., 1974; Schweyen et al., 1976) der jeweilige ρ^0 -Klon gewonnen. Die ρ^0 -Revertante sowie der entsprechende ρ^0 -Stamm wurden mit der Ausgangs- cob^- -Mutante gekreuzt und die diploide Nachkommenschaft hinsichtlich des Wachstums auf YG überprüft. Tab.1 stellt die theoretischen Möglichkeiten, die sich aus diesen Testkreuzungen ergeben können, dar (Dujardin et al., 1980).

Tab.1: Rückkreuzung der rho⁺-Revertante sowie des abgeleiteten rho⁺-Stammes mit der Ausgangsmutante;
 Typ 1 und 2: SUP⁻ ist karyotisch (Typ 1: dominant; Typ 2: rezessiv); Typ 3: SUP⁻ ist mitochondrial kodiert;
 *es treten daneben, als Ergebnis der mt Segregation, auch Diploide des Typs a/α(sup⁺cob⁻), (rd) auf. Da das gesamte Zellgemisch getestet wurde, sind diese Kolonien nicht zu differenzieren.

Kreuzung:	Revertante	x	Testerstamm
A:	R/rho ⁺ cob ⁻	x	WT/rho ⁺ cob ⁻
B:	R/rho ⁺	x	WT/rho ⁺ cob ⁻

Diploide	Phänotyp/YG	Genotyp	Art der Reversion
Typ1 A)	+	α/a SUP ⁻ /sup ⁺ (rho ⁺ cob ⁻)	dominanter Kern-suppressor
B)	+	α/a SUP ⁻ /sup ⁺ (rho ⁺ cob ⁻)	
Typ2 A)	-	α/a sup ⁻ /SUP ⁺ (rho ⁺ cob ⁻)	rezessiver Kern-suppressor
B)	-	α/a sup ⁻ /SUP ⁺ (rho ⁺ cob ⁻)	
Typ3 A)	+	α/a (rho ⁺ cob ⁻ SUP ⁻) [*]	mitochondrialer Suppressor
B)	-	α/a (rho ⁺ cob ⁻ sup ⁺)	

Die meisten Revertanten zeigten einen mt kodierten Vererbungstyp; nur wenige Prozent schienen auf einen dominanten Kernfaktor (SUP⁻) zurückzuführen zu sein. Rezessive Kernfaktoren wurden für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt. Durch die Ergebnisse der aufgeführten Testkreuzungen ließen sich folgende karyotische Revertanten feststellen:

Revertante	Wachstum bei	23° C	30° C	36° C
M1301/101		+++	+++	+
M1301/107		+++	+++	+++
M1301/112		++	++	+
M1301/117		+++	+++	-
M1301/118		+++	+++	-

Die Revertanten R1301/101, R1301/117 und R1301/118 wurden weiter untersucht, um jenes Gen zu klonieren, das den Spleißdefekt von M1301 supprimiert.

Der kernabhängige Vererbungsmodus von R1301/101, R1301/117 und R1301/118 wurde durch die Tetradenanalyse bestätigt. Die Revertanten wurden dazu als ρ^+ -Stämme (SUP^-/ρ^+) mit der Ausgangsmutante (sup^+/ρ^+cob^- (M1301)) gekreuzt (vgl. Tab.1/Typ1B), die Diploiden sporuliert und die erhaltenen Sporen analysiert. Die Sporen aus den Testkreuzungen mit den genannten drei Revertanten zeigten eine 2:2 Aufspaltung bezüglich des Wachstums auf Glycerin, die der Verteilung der SUP^- -Allele entspricht ($2SUP^-:2sup^+$). Für R101 wiesen von acht getesteten Tetraden sechs eine 2:2 und zwei eine 3:1 Aufspaltung auf.

In einem weiteren Test wurde der ρ^+ -Stamm der Revertante R101 mit einem WT-Stamm gekreuzt und der Phänotyp der aus dieser Kreuzung erhaltenen Sporen überprüft. Mit Ausnahme von wenigen, spontan entstandenen ρ^+ -Klonen waren alle 4 Sporen einer Tetrade in der Lage, auf Glycerin zu wachsen. Dies bedeutet, daß die SUP^- -Mutation in ρ^+cob^- -Zellen (mit WT-Mitochondrien) keinen Phänotyp besitzt.

Von den durchgeführten Testkreuzungen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

1. Nur ein Kernfaktor ($SUP\ 101$) ist für die Suppression des Spleißdefektes von cob^- (M1301) verantwortlich;
2. Die Suppressormutation ist dominant;
3. Die Suppression ist unvollständig, da $SUP101$ (M1301) ein temperaturabhängiges Wachstum aufweist.

2.2.2 Rekombinationsanalyse der mt Revertanten

Mt Revertanten wurden mit Hilfe der quantitativen Rekombinationsanalyse auf das Vorhandensein einer extragenischen Suppressormutation getestet. Aus der Kreuzung WT x Revertante entstehen Diploide, die neben Parentaltypmitochondrien auch rekombinante Organellgenome besitzen. Der Prozentsatz der Rekombinanten (Rekombinationsfrequenz) ist mit dem Abstand zweier Marker auf der genetischen Karte korreliert. Die Kreuzung sämtlicher Revertanten mit dem WT und der Test auf Atmungskompetenz ergab unter den Sporen keine atmungsdefekten Rekombinanten, was gegen das Vorhandensein einer "Second-site"-Suppressormutation spricht. Die Rekombinationsfrequenzen zwischen mt Markern sind allgemein hoch, so daß eine Distanz von wenigen hundert Basenpaaren zwischen cob⁻ und SUP⁻ zur Entstehung von >1% Rekombinanten genügen sollte. Die untersuchten Suppressormutationen liegen demnach in unmittelbarer Nähe der Ursprungsmutation.

Eine ähnliche Kopplung war durch genetische Untersuchungen von Revertanten zu M4873 erhalten worden; die nachfolgende Sequenzierung bestätigte die genetischen Befunde (Schmelzer et al., 1982). bI1 scheint in dieser Hinsicht im Vergleich zu anderen Introns eine Besonderheit darzustellen. So sind erstens relativ wenige Mutationen innerhalb des Introns bekannt und zweitens nur solche Revertanten zu isolieren, welche eine Sekundärmutation in der Nähe der Ausgangsmutation aufweisen (Kap.2.3), so daß "Second-site"-Suppressoren fehlen.

2.3 Charakterisierung von mt Revertanten durch die DNA-Sequenzanalyse

2.3.1 WT- und Pseudo-WT-Revertanten

Aus dem Kollektiv der isolierten Revertanten zu M1301 mit mt kodierten Suppressormutationen wurden 6 für die Bestimmung der bII-Nukleotidsequenz verwendet. In der Hoffnung, Revertanten mit Sekundärmutationen zu isolieren, wurde eine Auswahl von konditionalen Revertanten getroffen. Es war zu erwarten, daß einige dieser Revertanten aufgrund einer veränderten Primärsequenz (Pseudo-WT-Revertanten) das Intronspleißen beeinträchtigen könnten und deshalb durch ein temperaturabhängiges Wachstum auf YG zu erkennen wären.

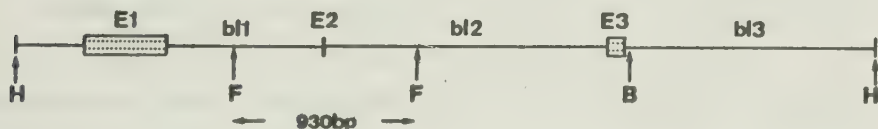


Abb.6: Position des für die Sequenzierung benutzten Hinfi/Hinfi-Fragmentes (930bp); B=BamHI; F=Hinfi; H=HpaII;

Zur Isolierung eines für die Sequenzierung geeigneten Fragmentes ließ sich aus der Gesamt-mt DNA ein 4,3 kbp großes HpaII-Fragment gewinnen, welches vom 5'-Ende der COB-Region bis in das Intron bI3 reichte (vgl. Abb.6). Dieses Fragment wurde mit BamHI und Hinfi restringiert, ein 930 bp großes Subfragment isoliert und am 3'-Ende markiert. Die markierten Hinfi-Einzelstränge wurden auf 6%-igen Polyacrylamidgelen getrennt und nach der Methode von Maxam-Gilbert sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse der

6 verschiedenen Revertanten sind in Tab.2 wiedergegeben.

Tab.2: Nukleotidsequenzen des Wildtyps, der Mutante M1301 und der isolierten mt Revertanten. Die dargestellten Sequenzen liegen 503-513 bp von der 5'-Spießgrenze entfernt; cs, kältesensitiv; hs, hitzesensitiv;

WT 777-3A	-	5'-..AAAAAGCTAA..-3'
M1301	-	..AAAA-GCTAA..
R1301/3	cs/hs	..AAAAGGCTAA..
R1301/5	-	..AAAAGGCTAA..
R1301/13	cs	..AAAAGGCTAA..
R1301/65	cs	..AAAAGGCTAA..
R1301/140	hs	..AAAAGGCTAA..
R1301/169	cs/hs	..AAAAGGCTAA..

Drei Revertanten besitzen die Nukleotidsequenz 5'-AAAAA-3', d.h. die Reversion kam durch eine +1A-Insertion in die Sequenz von M1301 zwischen den Positonen 503 und 507 zustande, wobei die WT-Sequenz wiederhergestellt wurde. Drei andere Revertanten kompensieren die -1A-Deletion der Ausgangsmutation durch eine +1G-Insertion an Position 507, so daß eine neue Sequenz 5'-AAAAG-3' entsteht.

Zur Klärung der Frage, ob das temperaturabhängige Wachstumsverhalten der Pseudo-WT-Revertanten auf dieser neuen Sequenz beruhte, wurden die konditionalen Revertanten mit der Ausgangsmutante M1301 gekreuzt. Aus der Kreuzung der konditionalen Revertante R1301/65 mit M1301 gingen jedoch Rekombinanten mit WT-Wachstum (Glycerin-positiv; nicht konditional) hervor; dadurch wurde gezeigt, daß die Temperatursensitivität auf einer sekundären Muta-

tion beruht, die vom SUP⁻-Genlocus getrennt werden kann (vgl. Abb.7). Dasselbe Ergebnis wurde für die WT-Revertanten R1301/13 und R1301/140 erhalten, während der hitzesensitive Phänotyp der Revertante R1301/169 durch eine Kernmutation (pet⁻) bedingt war.

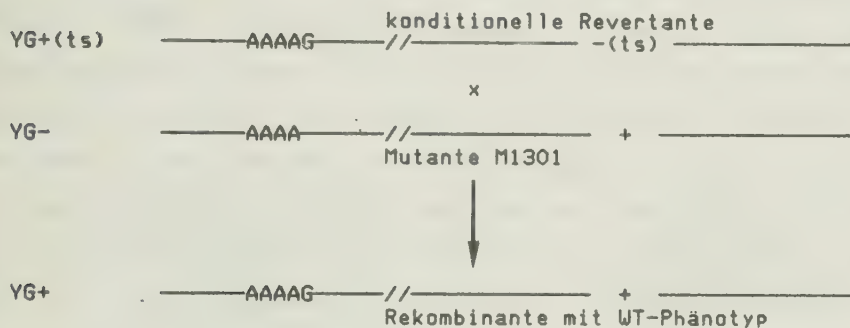


Abb.7: Rekombinationskreuzung von konditionellen Revertanten mit der Ausgangsmutante. Das Auftreten von Rekombinanten mit WT-Charakter zeigt, daß die Temperatursensitivität der Revertanten auf sekundäre, nicht gekoppelte Mutationen zurückgeführt werden kann.

Die Sequenzierung von konditionellen Revertanten führte somit zur Isolierung von Revertanten mit zusätzlichen Mutationen, welche nicht an die Spleißfunktion gekoppelt sind. Es scheint, daß in Pseudo-WT-Revertanten das Intronspleißen mit identischer Effizienz wie beim WT geschieht.

Die Auswahl der Revertanten (bevorzugt ts-R.) zielte auf solche mit veränderten Sequenzen und Spleißverhalten. Es konnten aber nur die beschriebenen Revertanten gefunden werden. Dies bedeutet, daß die WT-Sequenz 5'-AAAAA-3' oder die Pseudo-WT-Sequenz 5'-AAAAG-3' die Exzision von b11 erlaubt, daß aber keines der anderen möglichen Pentanukleotide (18 Möglichkeiten), welche durch eine +1bp-Insertion in 5'-AAAA-3' gebildet werden können, die

Spleißfunktion wiederherstellt. Es ist daher anzunehmen, daß die funktionelle Bedeutung dieser Sequenz weniger auf der Ebene der Sekundär- als vielmehr auf der Ebene der Primärstruktur liegt, da die Sekundärstruktur durch verschiedene Revertanten-Mutationen wiederhergestellt werden könnte.

Wie M1301 wird auch eine andere Mutation in bI1, M4873 (Deletion von -1G aus einer Serie von 5G) durch nur zwei Reversionstypen supprimiert; entweder durch die Wiederherstellung der WT-Sequenz, durch die Insertion eines G oder die Transition eines A neben der Serie von 4 G, wobei die Deletion beibehalten wird (Schmelzer et al., 1982). Durch die Transition wird zwar der "Miniloop" in Originalgröße erhalten, die Stammstruktur bleibt jedoch in der mutierten Form. Der Primäreffekt der Mutation scheint demnach in der Veränderung der "Loopstruktur" zu liegen (vgl. Abb.5).

Beiden Mutanten, M1301 und M4873, ist gemeinsam, daß sie in einer Sequenz liegen, welche in bI1 und aI5c konserviert ist. Sie zeigen einen ähnlichen Mutationstyp und werden durch ähnliche Sekundärmutationen supprimiert; in beiden Sequenzen scheint der "Loopstruktur" eine gewisse Bedeutung zuzukommen.

2.3.2 Reversion durch Intron-Deletion

Der HpaII-Restriktionsverdau der mt DNA eines Revertantenstammes (RU1) wies ein verändertes Muster auf; die erwartete 4,2 kbp große COB-Bande war auf 3,5 kbp verkürzt (siehe Abb.8A). Zum Nachweis der Identität dieser Bande waren Southern-Experimente notwendig.

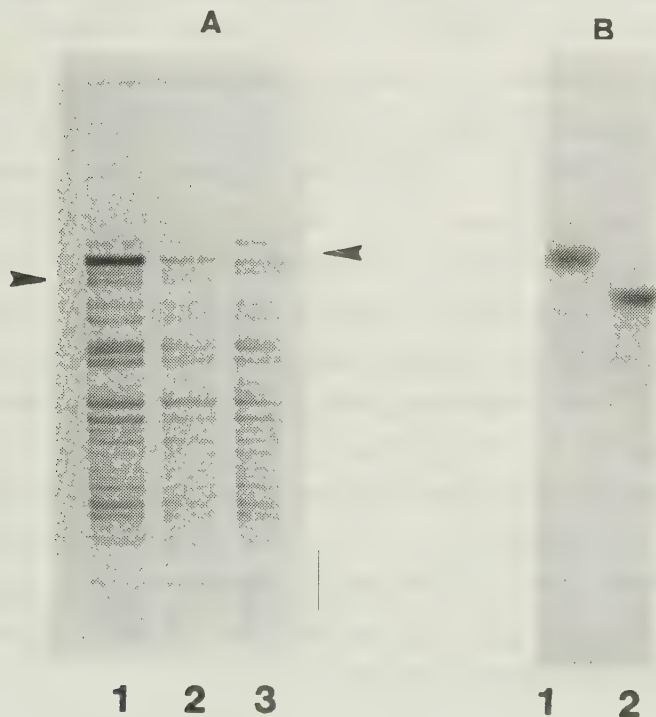


Abb.8A: Verkürzung eines 4,2 kbp großen WT-HpaII-Fragmente auf 3,5kbp im Revertantenstamm RU1 (1 und 2=RU1; 3=WT/777-3A). In ungefährer Höhe des 4,2 kbp großen HpaII-Fragments tritt in RU1 (und einigen anderen Stämmen) eine zusätzliche nicht mitochondriale DNA-Bande als Verunreinigung auf;

Abb.8B: Southerhybridisierung mitochondrialer DNA des WT und der Revertante RU1 mit einer E1/bII-spezifischen Probe (1=WT; 2=RU1);

Mt DNA von 777-3A sowie RU1 wurde mit HpaII restringiert, über ein 0,7%-iges Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit zwei verschiedenen nicktranslatierten Proben hybridisiert. Beide Proben stammten aus einem in pBR 322 klonierten 3 kbp großen HpaII/BamHI-Fragment, welches den Bereich von Exon 1 bis Intron 3 umfaßt. Die erste Probe bestand aus einem Sau3A-Fragment, das Exon 1- und Intron 1-Anteile besitzt. Für die zweite Probe wurde durch einen Doppelverdau ein 450 bp großes BglII/XbaI-Fragment isoliert, welches innerhalb von bII liegt. Größe und Positionen der Fragmente sind aus Abb.9 zu entnehmen. Die Southern-Analyse ergab, daß mit der E1/bII-Probe jeweils nur eine Bande von RU1 bzw. 777-3A hybridisiert hatte, wobei diese Bande im Fall der Revertante um ca. 750 bp verkürzt war (vgl. Abb.8B). Bei Wiederholung des Experimentes mit der bII-Probe ohne Exonanteile findet sich kein Signal in der Höhe der verkürzten RU1-Bande, während die COB-Bande des Wildtyps hybridisiert. Diese Daten ließen vermuten, daß in der vorliegenden Revertante die bII-Sequenz von 765 bp ganz oder doch weitgehend deletiert war, so daß sich mit einer bII-Probe keine Hybridisierung erhalten ließ. Als sicher konnte gelten, daß die BglII-Schnittstelle, 15 Nukleotide vom I1/E2-Übergang entfernt, in der Revertante deletiert war, da durch ein Nachschneiden mit BglII die entsprechende HpaII-Bande nicht verkürzt wurde.

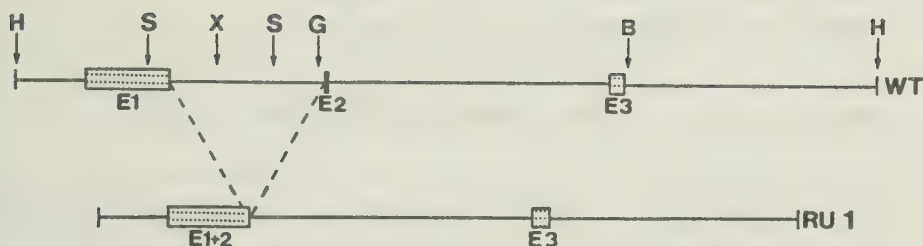


Abb.9: Darstellung der Restriktionsschnittstellen in E1 und bI1, die zur Konstruktion der spezifischen DNA-Proben verwendet wurden. Diese Proben dienen zur Charakterisierung der Deletionsmutante RU1. B=BamHI; G=Bgl II; H=HpaII; S=Sau3A; X=XbaI;

Die nächste Aufgabe bestand in einer genauen Charakterisierung der Größe dieser Deletion. Zur Isolierung eines Fragmentes, welches für die Sequenzierung nach Maxam-Gilbert geeignet war, wurde ein 2,3 kbp großes HpaII/BamHI-Fragment von RU1 in den Vektor pBR 322 kloniert, der mit ClaI/BamHI geschnitten worden war. Aus diesem Klon wurde ein 1,6 kbp großes ScaI/BamHI-Fragment gewonnen, mit AhaIII nachgeschnitten, und ein 280 bp großes ScaI/AhaIII-Fragment isoliert. Die Markierung erfolgte mit γ -ATP und T4-Polynukleotidkinase. Nach der Strangtrennung auf 5%-igen Acrylamidgelen wurden beide Banden isoliert und sequenziert. Ein Vergleich mit der WT-Sequenz von D273-10B zeigt, daß das 3'-Ende von Exon bI1 direkt an das 5'-Ende von Exon B2 grenzt, somit die Intronexzision exakt, d.h. basengenau erfolgt war. In Abb.10 ist die Sequenz der durch die bI1-Deletion entstandenen Exon 1/ Exon 2-Nahtstelle wiedergegeben. Eine Überprüfung der Sequenz in einem Bereich von 150 bp stromaufwärts sowie 50 bp stromabwärts

von der Exon 1/Exon 2-Nahtstelle erbrachte keinen Basenaustausch zwischen WT- und Revertanten-Sequenzleiter.



Abb.10: Sequenz von RU1 an der Exon1/Exon2-Nahtstelle;

Der Phänotyp der Revertante RU1 war auf Glycerinmedium nicht konditional oder "leaky", so daß der Verlust des Introns keineswegs zu einem verminderten Wachstum auf Glycerin führt. Minimale Wachstumsunterschiede oder der Einfluss auf andere biologische Prozesse können jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden.

Die Isolierung von spontan auftretenden Revertanten mit Introndeletionen war zunächst unerwartet. Gleichzeitig mit der Entdeckung der intronlosen Revertante RU1 wurde beobachtet, daß in Stämmen, bei denen das mt Genom von M1301 mit dem Kerngenom von AH215/216 kombiniert worden war, sehr häufig Revertanten entstehen (vgl. Kap.3.2.3). Diese sind frühestens nach 6 Tagen Wachstum sichtbar. Abb.12 zeigt solche spontane Revertantenkolonien, ca. 12 Tage nach Überstempeln auf Glycerin. Die Charakterisierung der Revertanten ergab, daß sie wie die Revertante RU1 auf einer exakten Introndeletion beruhen (S.Classen, pers. Mittlg.). Es zeigte sich, daß die Häufigkeit der Reversion durch Introndeletion in großem Maße mit der Art des Kernhintergrundes korreliert ist, daß dieser Reversionsmechanismus sich jedoch nicht auf einen bestimmten Stamm beschränkt. Während in den Stämmen IC8/AA1 bzw. IC11/AA2 Revertanten mit einer Häufigkeit von 10^{-8} auftreten, ist die Rate in den Stämmen AH215/216 auf 10^{-7} erhöht. Der Prozent-

satz der bII-Deletion verglichen mit anderen Reversionstypen beträgt jedoch 10% für IC8/AA1/IC11/AA2 und 80% für AH215/216. Die Rate der Introndeletion liegt folglich im IC8/AA1 bzw. IC11/AA2 bei 10^{-9} und im AH215/216 bei 10^{-7} und ist somit um zwei Zehnerpotenzen erhöht.

Dies zeigt, daß die höhere Reversionsrate von AH215/216(M1301) auf die signifikant große Häufigkeit von Introndeletionen zurückzuführen ist. Die Tetradenanalyse zur Untersuchung des Vererbungsmodus ergab, daß dieser Effekt durch mehrere Kernfaktoren bedingt ist (R.J. Schweyen, pers. Mittlg.).

Gargouri et al. (1983) führten genaue Untersuchungen über die Häufigkeit von Introndeletionen bei 16 verschiedenen Mutanten der Introns bII-bI3 durch. Die ermittelten Werte für das Auftreten spontaner Revertanten mit prozessierten Genen liegen bei 2×10^{-7} und 2×10^{-8} und entsprechen dem Wert, mit dem Rück- oder Suppressormutationen gefunden werden. Diese Rate ist bei weitem zu häufig, um mit einer zufälligen Deletion, gefolgt von einer intrazellulären Selektion erklärt zu werden.

Revertanten, die auf der Deletion des mutierten Introns basieren, wurden bei allen drei Introns (bII-bI3), ausgehend von Stämmen mit Mutationen in *cis*- oder *trans*-aktiven Elementen isoliert. Hill et al. (1985) identifizierten eine Revertante mit einer Deletion von bI5 ausgehend von einer atmungsdefekten Kernmutante (cbp2), die spezifisch die Exzision dieses Introns aus dem COB-Gen verhindert. Es wurde dadurch gezeigt, daß nicht nur Mutationen im mt Genom, sondern auch Mutationen im Kern den so ausgelösten Spleißdefekt durch die Deletion des entsprechenden Introns auf DNA-Ebene umgehen können.

Es ist anzunehmen, daß der Reversionsmechanismus durch Introndeletion allgemeiner Art ist, sich demnach nicht auf Cytochrom b beschränkt, sondern auch in anderen Mosaikgenen auftritt. Introndeletionen auf DNA-Ebene betreffen häufig nicht nur ein Intron, sondern zwei oder drei. Multiple Introndeletionen finden sich sogar weitaus häufiger als Einzeldelationen (Gargouri et al., 1983). Bei der RNA-spleißdefekten Mutante M1301 kommen ebenfalls Revertanten mit der gleichzeitigen Deletion von zwei Introns vor. Es lassen sich zwei Klassen unterscheiden:

1. bI1 deletiert;
2. bI1 und bI2 deletiert,

wobei jedoch die zweite Klasse selten zu finden ist. Die Existenz multipler Introndeletionen läßt gewisse Aussagen bezüglich des Mechanismus der Introndeletion auf DNA-Ebene zu; diese werden in Kapitel IV näher erläutert.

3. Charakterisierung einer Kernrevertante

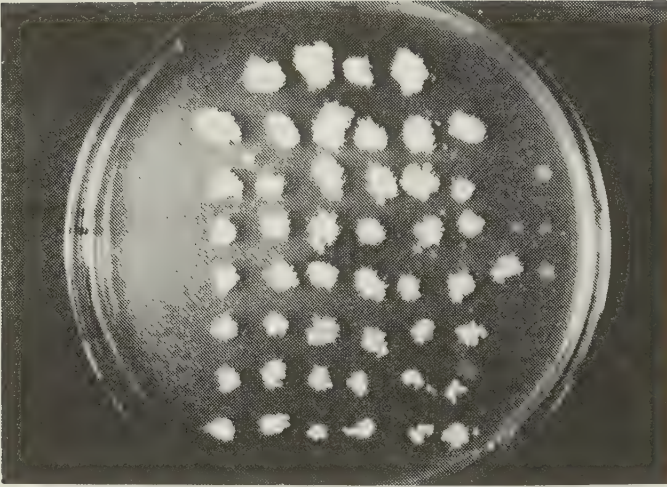
3.1 Untersuchung des Phänotyps

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurden neben mitochondrialen mit geringer Häufigkeit auch karyotische Revertanten isoliert, darunter SUP101. Es ist zu erwarten, daß solche Mutationen Kerngenprodukte betreffen, die direkt oder indirekt an der Exzision von bII beteiligt sind. Zur Überprüfung der Funktion dieses Allels sollte das durch die SUP101-Mutation veränderte Kerngen mittels molekularer Klonierung isoliert werden; im weiteren sollten dessen Nukleotidsequenz bestimmt und Untersuchungen zur Expression des Gens durchgeführt werden.

3.1.1 Temperatursensitivität

Der Stamm R101 schien für die Klonierung gut geeignet, da dieser ein hs-konditionales Wachstum zeigt. Die temperaturabhängige Suppression sollte auch bei Transformation mit dem klonierten Gen auftreten; dies würde solche Transformanten von der Mehrzahl der spontan auftretenden WT-Revertanten unterscheiden. Abb.11 zeigt das Wachstumsverhalten der Kernrevertante SUP101 bei 23°C, 30°C, sowie 36°C. Tieftemperaturcytochromspektren (vgl. Abb.12) beweisen, daß die spektralen Banden von Cytochrom b und Cytochrom aa₃ bei SUP101 vorhanden sind, während der mt Mutante M1301 die Cytochrom b-Bande fehlt.

A



B

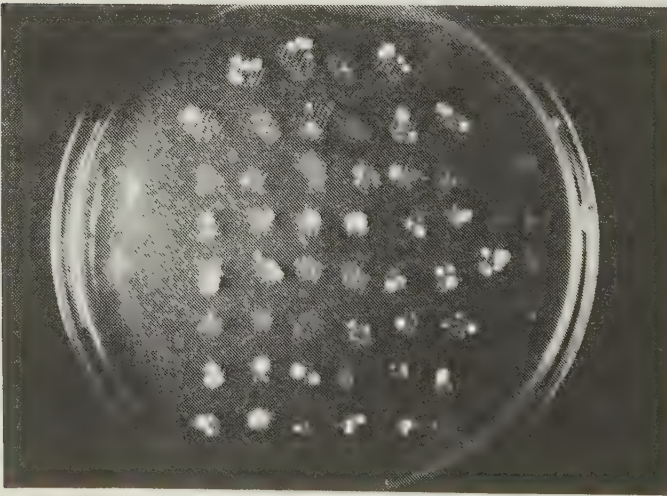


Abb.11: Wachstumsverhalten von SUP101 bei 23°C/30°C (A) und 36°C (B); die auftretenden Pusteln sind größtenteils auf spontan entstandene Revertanten mit einer Deletion von *bII* zurückzuführen (vgl. Kap.2.3.2).

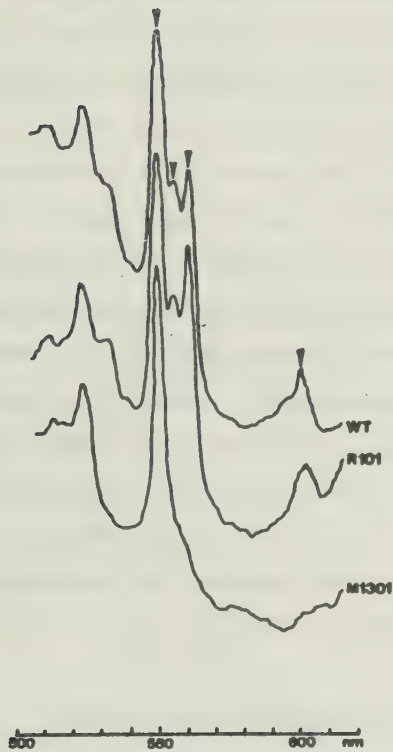


Abb.12: Tieftemperaturspektren des WT, der Revertante R101 und der Mutante M1301; Cytochrom c(547nm), c₁(553nm), b(558,5nm), a₃(602nm);

3.1.2 Allelspezifität

Ein weiteres Kriterium für die Wahl der Revertante R101 zur Klonierung war deren strikte Allelspezifität für M1301. Zur Bestimmung des Aktionsspektrums dieser dominanten Suppressormutation wurden durch genetische Kreuzungen Diploide erzeugt, welche hinsichtlich des SUP-Allels heterozygot waren ($\text{sup}^+ / \text{SUP}^-$) sowie je eine der getesteten cob^- - bzw. oxi3^- -Mutationen trugen. Es

wurden insgesamt 135 cob^- und 150 $oxi3^-$ -Stämme verwendet, so daß Mutanten in allen Bereichen der Gene COB und OXI3 überprüft wurden. Das Ergebnis dieser Kreuzungen bewies, daß nur die Kombination von SUP^+/sup^+ mit cob^- (M1301) das Wachstum auf Glycerin ermöglicht, während der atmungsdefekte Phänotyp aller anderen Mutanten durch SUP101 nicht supprimiert werden kann.

Mit der Revertante R101 liegt ein funktioneller Suppressor vor, der einen Gen-spezifischen Mechanismus aufweist und aus diesem Grund für die vorgesehenen Untersuchungen interessant erschien. Dujardin et al. (1980) und Groudinski et al. (1981) identifizierten eine kernkodierte Revertante (NAM-2), welche unterschiedliche, mutierte Allele supprimiert und somit Gen-unspezifisch agiert. NAM-2 stellt wahrscheinlich das mutierte Allel einer tRNA-Synthetase dar, deren Suppression möglicherweise durch ein "misreading" aufgrund eines veränderten Codongebrauches zustande kommt (Labouesse et al., 1985).

3.2. Klonierung des komplementierenden Allels

Mit der Möglichkeit, DNA in *S. cerevisiae* einzuführen und eine Selektion über die Komplementation auszuüben, kann grundsätzlich jedes beliebige Hefegen isoliert werden. Bei der Klonierung von Genen aus *S. cerevisiae* unterscheidet man folgende Schritte:

1. Konstruktion einer Genbank in einem Vektor, der sowohl in Hefe, als auch in *E. coli* replizieren kann ("shuttle"-Vektor);
2. Wahl der Bedingungen unter denen das Vorhandensein eines Gens geprüft oder selektiert werden kann;
3. Verifizierung, daß ein Klon das gesuchte Gen enthält.

Grundsätzlich können zwei Transformationstypen unterschieden werden:

1. Die Integration von transformierter DNA in das Hefechromosom durch eine Rekombination zwischen homologen Sequenzen (Abb.13);
2. Die autonome Replikation der transformierten DNA als circuläres Plasmid.

In letzterem Fall enthält das Plasmid spezifische Hefesequenzen, die als Replikationsorigin dienen. In der Regel sind dies Sequenzen des 2 μ -Plasmids oder sogenannte ARS-Sequenzen ("autonomous replicating sequences") von Hefe oder anderen Organismen (Beggs, 1978; Hinnen und Meyhack, 1982). Transformanten mit integrierter DNA vererben die transformierten Hefe-Markergene stabil, während Transformanten mit autonom replizierender DNA segregieren.

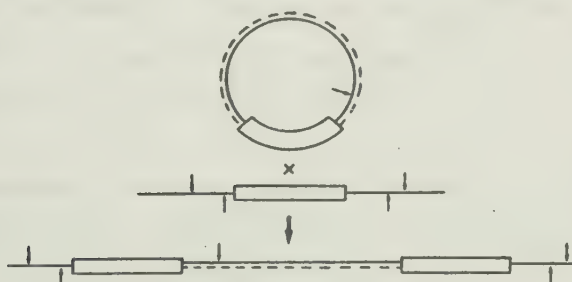


Abb.13: Transformation durch Integration in das Hefechromosom;
↓..... Restriktionsschnittstellen
- - - - Vektor-DNA

3.2.1 Erstellung einer Genbank

Die Isolierung des SUP⁻-Allels bedingt die Erstellung einer Genbank vom Stamm R101, da die etablierten Genbanken von WT-Stämmen abgeleitet sind und demzufolge das vermutlich nicht supprimier-

rende WT-Allel (sup^+) enthalten. Für die Klonierung des SUP101-Allels standen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum ersten die Erstellung einer Genbank in *E. coli*, in welcher statistisch abgesichert jedes Hefegen mindestens einmal vertreten ist, zum zweiten, die direkte Transformation von Hefe.

Da die direkte Transformation von Hefe eine gute Reproduzierbarkeit der Transformation nicht gewährleistet, wurde die erste Methode gewählt. Daneben sprachen auch die vereinfachten Kontrollen für die Erstellung einer Genbank in *E. coli*.

Die chromosomale DNA des Suppressorstammes wurde durch eine Präparation von Kern-DNA des rho^+ -Stammes von SUP101 gewonnen und mit BamHI partiell verdaut. Zu diesem Zweck wurde in Vorversuchen aus einem Testansatz mit definierten Mengen an Enzym und DNA nach jeweils 5 Minuten ein Aliquot entnommen, die Reaktion gestoppt, und die Proben auf einem Agarosegel in Gegenwart von Molekulargewichtsmarkern aufgetrennt. Die Fragmentgröße ist gegenüber der Zeit umgekehrt proportional; unter den gewählten Bedingungen wurde nach ca. 35 Minuten Fragmente mit einer Länge von 10 kbp erhalten. Fragmente, die kleiner als 10 kbp sind, schienen nicht geeignet, da diese überproportional gut transformiert werden. Daneben steigt das Risiko, daß das zu klonierende Gen durch eine möglicherweise vorhandene BamHI-Schnittstelle zerstört wird.

Als Plasmid wurde der Hefe-"shuttle"-Vektor YEp13 (Broach et al., 1979) gewählt, welcher extrachromosomal repliziert und in ca. 30 Kopien/Zelle vorkommt. YEp13 besitzt Replikationsorigins für Hefe (aus dem 2 μ -Plasmid) und *E. coli* (aus pBR 322) und als Marker Ampicillin- und Tetracyclinresistenzen sowie das LEU2-Gen (Ratzkin und Carbon, 1977) für Hefe (vgl. Abb.14). Die Schnitt-

stelle für BamHI liegt innerhalb der Tetracyclinresistenz (tet^r), so daß der Vergleich von $amp^r tet^r / amp^r tet^r$ eine Aussage über die Effizienz der Transformation erlaubt. Zur Erhöhung dieses Quotienten wurde YEp13-DNA nach der Restriktion dephosphoryliert.

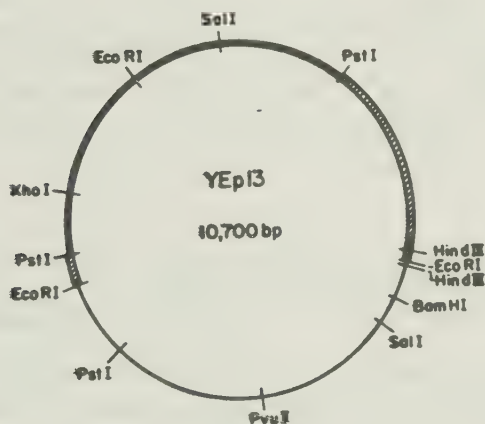


Abb.14: Schematische Darstellung des autonom replizierenden Vektors YEp13; die dünne Linie kennzeichnet pBR 322-Sequenzen, die dicke Linie Hefesequenzen einschließlich des LEU2-Gens; schraffierte Bereiche markieren 2µ-Sequenzen (nach Broach, 1979).

Partiell verdaute Hefe-DNA wurde mit BamHI restringierter Vektor-DNA (im Verhältnis 5:1) ligiert und zur Transformation des E. coli Stammes 490 rec A⁻ verwendet. Tab.3 zeigt das Ergebnis dieses Versuches; für eine Stichprobe von Klonen wurde nach Minipräparationen die Insertlänge und der Prozentsatz von $amp^r tet^r$ -Klonen festgestellt. Aus der Anzahl von $amp^r tet^r$ -Klonen und der Insertlänge kann, unter der Annahme, daß die $amp^r tet^r$ -Klone tatsächlich ein Insert besitzen, auf die Zahl der klonierten kbp hochgerechnet werden.

Tab.3: Überprüfung der Genbank durch die Bestimmung der klonierten kbp;

Anzahl der erhaltenen Transformanten	mittlere Insertgröße	Transformanten $amp^r tet^r$	Anzahl der Transformanten mit Insert	klonierte bp
17500	7,5 kbp	60%	10500	78750 kbp

Nachdem mit ca. 79000 kbp ein Mehrfaches des Hefegenoms (18000 kbp) kloniert worden war, wurde eine Hefetransformation durchgeführt. Es war anzunehmen, daß im Mittel jedes Gen ca. vier Mal enthalten war. Damit bestand eine gute Chance das SUP 101-Allel zu isolieren.

3.2.2 Konstruktion eines Empfängerstammes

Als Empfängerstamm war ein geeigneter Hefestamm vorbereitet worden, an den folgende Bedingungen geknüpft waren:

1. Der Stamm sollte gute Transformationsraten aufweisen;
2. Im LEU2-Gen eine Mutation besitzen;
3. Im mt COB-Gen die Mutation M1301 tragen.

Zur Erfüllung der geforderten Voraussetzungen wurde ein für Hefetransformationen geeigneter Stamm AH215/216a, leu^- , his^- , $can1$ (Toh-e und Wickner, 1981) mit einer Transformationsrate von 10^3 - 10^4 Transformanten/ μ g DNA gewählt. Dieser Stamm wies eine Doppelmutation im LEU2-Gen auf, so daß die Reversionsrate weniger als 10^{-10} beträgt (Hinnen et al., 1978).

Mit Hilfe der Kernfusionsmutante IC11/AA2, his^- , $kar1$ (M1301) wurden in den rho^- -Stamm von AH215/216 Mitochondrien des Typs M1301 eingekreuzt. Der kar -Marker dieser Kernfusionsmutante ver-

hindert zu 90% die Karyogamie nach erfolgter Zytogamie, so daß aus Kreuzungen mit einem kar-Marker im wesentlichen Haploide hervorgehen. Auf diese Weise wurde ein Empfängerstamm, AH215/216a, leu⁻, his⁻ (M1301) mit guter Transformationseffizienz erhalten.

3.2.3 Komplementationstest

Für die Gewinnung von DNA für die Transformation wurde Plasmid-DNA aus einem "Pool" der Genbank präpariert, wobei die Anzucht der transformierten E. coli-Kulturen auf AMP-Platten erfolgte. Es ist wichtig, Flüssigkulturen und eine Amplifikation durch Chloramphenicol zu vermeiden, um eine Selektion auf kleine Insertgrößen oder eine Selektion des Parentalplasmids zu vermeiden. Durch die Anzucht auf Platten ist die Repräsentation aller Klone der Genbank gewährleistet.

Der (wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben) neu konstruierte Empfängerstamm wurde nach der Methode von Hinnen et al. (1978) mit Plasmid-DNA aus einem "Pool" der Genbank transformiert. Da das SUP⁻-Allel dominant über das entsprechende WT-Allel ist, wird der Spleißdefekt des Empfängerstammes in Transformanten, welche das SUP⁻-Allel erhalten haben, kompensiert.

Im ersten Transformationsansatz, für den 20µg DNA eingesetzt worden waren, ließen sich 6600 Transformanten auf LEU-Minimalmedium erhalten. 15 Transformanten aus diesem Ansatz wiesen auf Glycerin ein mehr oder weniger gutes Wachstum auf, und wurden in der Folge für genetische Untersuchungen ausgewählt.

3.2.4 Verifizierung des extrachromosomalen Vererbungsmodus

Neben Transformanten, deren Atmungskompetenz auf einer Komplementation der Mutante M1301 durch einen eingeführten hybriden Vektor beruht, ist auch mit Revertanten zu rechnen, bei denen die mit Mutation zum WT rückmutiert ist. Mit einer Häufigkeit von 10^{-7} ist die Reversionsrate der M1301 Mutation im Stamm IC8/AA1 relativ gering. Interessanterweise traten bei Transformationsexperimenten, bei denen M1301 mit dem Kernhintergrund von AH215/216 kombiniert worden war, Pusteln im Stempelabdruck mit einer Häufigkeit auf, die weit über der Reversionsrate im IC8/AA1 lag. Diese Revertanten waren frühestens 6 Tage nach Überstempeln auf Glycerin sichtbar und konnten deshalb von supprimierenden Transformanten, die zudem ein flächiges, nicht pustelförmiges Wachstum zeigten, unterschieden werden. Für Details über die Art und Entstehungsweise der Revertanten sei auf Kapitel 2.3.2 verwiesen. Um der hohen Reversionsrate von AH215/216 (M1301) Rechnung zu tragen, wurden für Transformationsexperimente stets Einzelkulturen des Empfängerstammes gewählt.

Eine erste Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Revertanten und Transformanten, die das SUP⁻-Allel besitzen, bietet der Plasmidverlusttest. Unter nicht selektiven Bedingungen, d.h. bei Wachstum der Transformanten auf Leucin-haltigem Medium, findet man mit großer Häufigkeit leu⁻-Segreganten. In der Regel beruht diese Instabilität auf einem Verlust des gesamten Plasmids und variiert zwischen 1-5% Segreganten pro Zellteilung für den Vektor pJDB207 und 40% Segreganten bei YE6 (Hinnen und Meyhack, 1982). Ursache ist, daß in Gegenwart der endogenen 2 μ -DNA vermutlich eine Inkompatibilität zwischen identischen Replikons besteht, die

um dieselben Enzyme im Wettbewerb stehen (Hollenberg, 1982). Aus nicht geklärtem Grund betreffen diese Verluste in der Regel das hybride Vektorplasmid, nicht das endogene Plasmid. Die Instabilität ist umgekehrt proportional zur Kopienzahl pro Zelle des Plasmids, die 50 für pJDB207 bzw. 5-10 für YEp6 beträgt. Außerdem erhöht sich die Instabilität durch die Insertion von DNA und der daraus resultierenden Vergrößerung des Plasmids.

Im Fall von YEp13 entstehen *leu*⁻-Segreganten mit einer Häufigkeit von 1% pro Generation. Diese Eigenschaft des Vektors ermöglicht die Untersuchung über eine Kopplung des selektierten Phänotyps mit dem LEU-Marker. Bei Revertanten wird die Segregation von LEU⁺ unabhängig von der Atmungskompetenz sein. Transformanten werden jedoch neben der LEU-Prototrophie auch die Fähigkeit, auf Glycerin zu wachsen, verlieren.

Zur Durchführung des Plasmidverlusttests wurden Transformanten mehrere Generationen lang in Vollmedium geschüttelt und zwei Mal Einzelkolonien ausgestrichen, welche auf Glycerin- und Leucin-Platten getestet wurden. Für drei Transformanten (N1, N2, N3) waren nach ca. 15 Generationen 9%, nach ca. 40 Generationen zwischen 55% und 83% *leu*⁻-Segreganten entstanden, wobei in allen Fällen die Atmungskompetenz gleichzeitig verloren gegangen war. Alle anderen untersuchten Transformanten wiesen eine unabhängige Segregation von LEU-Marker und Atmungskompetenz auf. Von den drei Transformanten, die eine Cosegregation der Atmungskompetenz und LEU-Prototrophie zeigten, wurde die Plasmid-DNA über "Minipräparationen" isoliert und der *E. coli* Stamm 490 *rec A*⁻ retransformiert. Es ließ sich zeigen, daß alle *amp*^r-resistenten Klone gleichzeitig *tet*^r waren, wie dies zu erwarten ist, wenn mit einem

hybriden Vektor transformiert wird. Von amp^r -Klonen wurde wiederum Plasmid-DNA gewonnen und der Stamm AH215 (M1301) retransformiert. Beide untersuchten Klone lieferten Transformanten, die atmungskompetent und LEU-prototroph waren. Diese Rücktransformation ist eine Bestätigung für eine Cotransformation von Plasmid und selektivem Phänotyp und schließt eine etwaige Doppeltransformation aus.

Die Retransformanten wiesen einen strikten hs -Phänotyp auf, was als Hinweis dienen konnte, daß das komplementierende Gen der Ausgangsmutante kloniert worden war. Die Insertlänge aller drei Klone (N1, N2, N3) betrug ca. 6,8 kbp, die nachfolgende Restriktionskartierung (Kap. 3.3) bewies, daß identische Fragmente vorlagen.

3.3 Physikalische Kartierung des klonierten Fragmentes

Zur Gewinnung von geeigneten Proben für notwendige Subklonierungsarbeiten wurde zunächst eine detaillierte Restriktionskarte des 6,8 kbp großen Fragmentes eines Klon (N3) erstellt. Verschiedene Fragmente dieses Inserts sollten im Komplementationstest überprüft werden und der für die Suppression verantwortliche Bereich weitgehend eingegrenzt werden. Für die Kartierung wurden Restriktionsenzyme verwendet, die Hexanukleotid- oder andere selten auftretende Erkennungssequenzen besitzen und deshalb nur wenige Subfragmente erzeugen.

Die Enzyme SalI und SmaI weisen keine Schnittstellen innerhalb des SUP101-Fragmentes auf. BglII spaltet das isolierte BamHI -Insert in zwei Fragmente. Da ein 5,1 kbp großes BglII/BamHI -

Fragment den Empfängerstamm AH215 (M1301) komplementierte, (vgl. Kap.3.4), konnte sich die detaillierte Restriktionskartierung auf dieses Fragment beschränken.

3.3.1 "Southern-cross-blot"-Verfahren

Es wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet, um eine Restriktionsanalyse des klonierten Inserts durchzuführen. Durch das sogenannte "Southern-cross-blot"-Verfahren ließ sich eine grobe Kartierung erreichen. Diese Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Hybridisierung mehrerer "Blots" in einem Transfersystem, so daß in relativ kurzer Zeit eine Karte erstellt werden kann.

Zu diesem Zweck wurde die DNA mit verschiedenen Enzymen restrigiert, über präparative Gele aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Ein weiterer Restriktionsansatz wurde mit ^{32}P an den 5'-Enden markiert und auf ein Papier mit speziellen Eigenschaften transferiert, welches DNA zwar bindet, aber nicht irreversibel fixiert. Die Fragmente dieses "Blots" dienen als Hybridisierungsproben. Für die Hybridisierung wurden mehrere Filter mit unmarkierten Fragmenten, um 90° versetzt, auf den Filter mit den markierten DNA-Banden gebracht. Unter bestimmten Pufferbedingungen werden die markierten DNA-Fragmente vom Filter mobilisiert und können durch die darüberliegenden Membranen diffundieren. Fragmente, welche identische Sequenzen mit der markierten Probe besitzen, werden mit dieser hybridisieren. Solche Homologien äußern sich als "Spots" auf dem Autoradiogramm (vgl. schematische Darstellung, Abb.15). Da für dieses Verfahren präparative Gele verwendet werden müssen, ist relativ viel DNA notwendig.

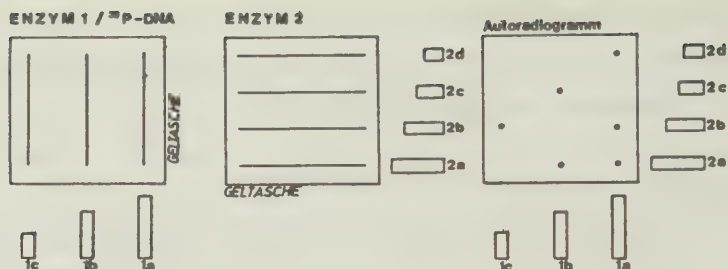


Abb.15: Die DNA wird mit mindestens zwei Enzymen (1 und 2) restringiert; Ansatz 1 wird mit ^{32}P markiert. Nach dem Transfer der DNA auf Membranen und der Hybridisierung im "cross-blot" sind auf dem Autoradiogramm "Spots" sichtbar, welche homologe Sequenzen von zwei Fragmenten offenbaren.

3.3.2 Southern-Analyse von Einzel- und Doppelrestriktionen

Aus diesem Grund und zur genauen Kartierung und Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse wurden in einem zweiten Verfahren Restriktionen angesetzt, für welche die Insert-DNA nicht nur mit einem, sondern parallel mit einer Kombination von je zwei Enzymen geschnitten worden war. Die daraus resultierenden Fragmente wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrocellulose überführt. Als Eichmarker dienten Restriktionsfragmente bekannter Länge (P22 x EcoRI; pBR322 x HaeIII/HindIII), die eine Molekulargewichtsbestimmung des Fragmentes in ausreichender Genauigkeit erlaubten. Durch den Einzelverdau der DNA wird die Anzahl und Größe der Restriktionsfragmente bestimmt, durch die Doppelrestriktion und die Überprüfung in einem Southernexperiment ist eine Zuordnung der Fragmente zueinander möglich. Als Hybridisierungsproben wurden hochgereinigte Fragmente verwendet, die aus

einem einfachen Restriktionsansatz resultierten und durch Nicktranslation radioaktiv markiert worden waren. Die Ergebnisse mit einem Enzym sind in Tab.4 dargestellt.

Tab.4: Darstellung der Fragmente, die aus dem Einzelverdau des 5,1 kbp großen BglII/BamHI-Fragmentes resultierten;

AccI	ClaI	DraI	EcoRI	HaeIII	HindIII	PstI
3100	3850	2500	2550	2700	3200	3550
2000	700	1350	1900	1600	1900	1600
	500	800	550	900		
		350	200			
		150				
Sau96/I	SphI	SalI	SmaI			
2400	4000	-	-			
1400	1150					
750						
650						

Als Hybridisierungsproben wurden folgende in Tab.5 aufgeführten Fragmente verwendet.

Tab.5: Auflistung der ^{32}P -markierten Proben, welche für die Southern-Hybridisierung verwendet wurden;

Probe	Enzym	Größe in bp
E1	EcoRI	2550
E2	EcoRI	1900
E3	EcoRI	550
E4	EcoRI	200
D3	DraI	800
D4	DraI	350

Jeder "Blot" wurde nach der Methode von Southern (1975) mit je einem der durch Nicktranslation markierten Fragmente hybridisiert. Alle Restriktionsfragmente, die einen Bereich der verwendeten Probe einschließen, werden aufgrund ihrer Hybridisierung mit dieser im Autoradiogramm als Bande sichtbar.

In Tab.6 ist das Ergebnis der Autoradiogramme zusammengefaßt. Die

markierten Proben sind der Reihe nach aufgeführt, wodurch die Zuordnung der Fragmente deutlich wird. Mit diesen Hybridisierungsexperimenten konnten die Daten aus Kap.3.3.1 ergänzt werden, und die in Abb.16 gezeigte Restriktionskarte erstellt werden.

Tab.6: Ergebnis der Southernhybridisierung; das 5,1 kbp große BglII/BamHI-Fragment wurde mit den aufgeführten Enzymen geschnitten und gegen die ^{32}P -markierten DNA-Proben markiert.

restrin- giert mit	^{32}P -markierte Proben:			E3	E4	E2
	E1	D3	D4			
AccI	1980 3100	1980 3100	3100	3100	3100	3100
ClaI	710 490 3850		3850	3850	3850	
DraI				350 2500	2500	
EcoRI		2550	2550 550			
HaeIII	880 1600	1600	1600 2700	2700	2700	
HindIII	1910 3200			3200	3200	3200
PstI	1580 3550			3550	3550	3550
Sau96/I	1410 750 650		650	650 2400	2400	2400
SphI	1160 4000			4000	4000	4000

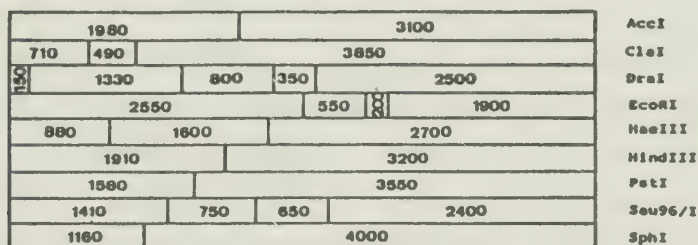


Abb.16: Restriktionskarte des komplementierenden BglII/BamHI-Fragmentes, das durch Subklonierung aus dem isolierten, genomischen 6,8 kbp großen BamHI-Fragment gewonnen wurde.

3.4 Subklonierung

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Restriktionskarte wurden verschiedene Fragmente des N3-Inserts für eine Subklonierung ausgewählt. Als erstes bot sich dafür ein 5,1 kbp großes BamHI/BglII-Fragment an. Die BglII-Schnittstelle eignet sich für eine rasche Subklonierung, da ihr kohäsives Ende mit BamHI kompatibel ist und somit in die BamHI-Schnittstelle des Vektors YEp 13 kloniert werden kann. Dieses Fragment war nach der Transformation in der Lage, den atmungsdefekten Empfängerstamm AH215 (M1301) zu komplementieren und grenzte somit den für die Suppression ver-

antwortlichen Bereich auf 5,1 kbp ein. Die Subklonierung weiterer Fragmente, deren Fähigkeit zur Suppression geprüft werden sollte, war erst nach der Addition von Linkern möglich, da durch die vorgegebene *leu*⁻-Auxotrophie des umgekreuzten Empfängerstammes (vgl. Kap. 3.2.2) die Auswahl an Vektoren (mit LEU-Marker) eingeschränkt war.

Bei Linkern handelt es sich um chemisch synthetisierte Oligodesoxyribonukleotide, die zumindest eine Erkennungssequenz und die zugehörige Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease besitzen (Scheller et al., 1977). Solche Moleküle können praktisch mit jeder DNA, die stumpfe Enden besitzt, fusioniert werden.

Nach Spaltung mit dem geeigneten Restriktionsenzym, in diesem Fall BamHI, entstehen die kohäsiven Enden, welche für die anschließende Klonierung benötigt werden (Abb.17). Die überhängenden Enden von DNA-Fragmenten, die für eine Subklonierung vorgesehen waren, ließen sich mittels Klenow-Polymerase und unter Zugabe aller vier Nukleotide auffüllen. Nach der Phosphorylierung der Linker an den 5'-Enden wurden Fremd-DNA und Linker in einer Ligasereaktion kovalent verbunden. Die Reaktionsprodukte wurden mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut, wodurch die Insert-DNA überhängende Enden derselben Nukleotidsequenz wie der Vektor erhielt und somit mit diesem ligiert werden konnte. Nach der Klonierung kann die Insert-DNA durch einen Schnitt mit demselben Restriktionsenzym wiedergewonnen werden.

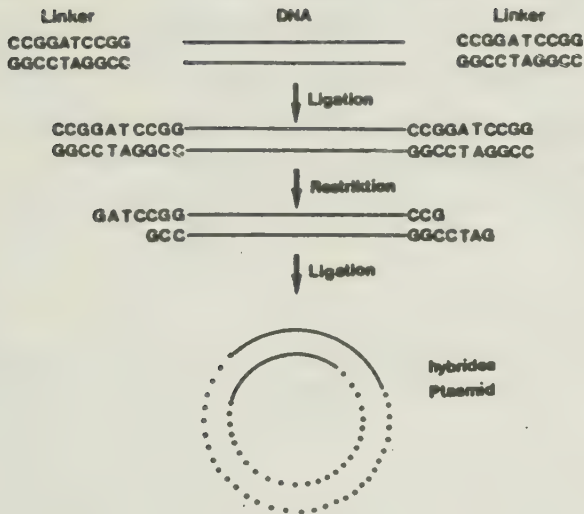


Abb.17: Verwendung von Linkern zur Klonierung in einen BamHI-geschnittenen Vektor.

Mit den auf diese Weise erhaltenen hybriden Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm SF 8 transformiert. Von $amp^r tet^r$ -Klonen konnte über DNA-Minipräparationen die Größe und Spezifität der Insert-DNA überprüft und der Hefe-Empfängerstamm transformiert werden. In Abb.18 sind alle Fragmente dargestellt, welche in Subklonierungsexperimenten untersucht wurden. Das 2,5 kbp große BamHI/DraI sowie das 3,9 kbp große BamHI/ClaI-Fragment waren nicht in der Lage, den spleißdefekten Empfängerstamm zu komplementieren, während sowohl das 2,6 kbp große BglII/EcoRI- wie auch das 2,0 kbp große BglII/AccI-Fragment suppressierten.

Wie in Kap. 3.2.3 ausgeführt, wurde aus positiven Hefetransformaten das Plasmid isoliert und *E. coli* transformiert. Aus diesen

rücktransformierten *E. coli*-Stämmen ließ sich die Plasmid-DNA gewinnen, welche für alle weiteren Experimente verwendet wurde. Das BglII/AccI-Fragment mit einer Größe von ca. 2 kbp konnte durch diese Ergebnisse als kleinstes, noch komplementierendes Fragment des N3-Inserts identifiziert werden.

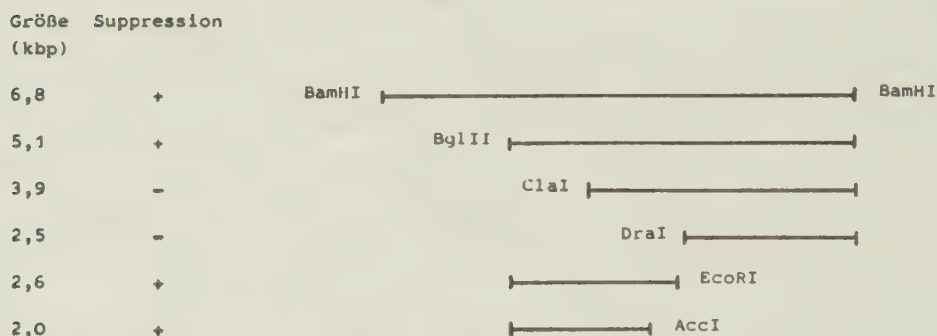


Abb.18: Darstellung der für die Subklonierung verwendeten Fragmente des N3-Inserts.

3.5 Sequenzierung

Durch weitere Subklonierungsarbeiten sollte der komplementierende Bereich näher eingrenzbar sein. Da dies letztlich zeitaufwendiger als eine Sequenzanalyse erschien, wurde das BglII/AccI-Fragment durchgängig sequenziert.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxymethode (Sanger et al., 1977). Es wurden zwei Verfahren kombiniert, nämlich die direkte Sequenzierung von Fragmenten sowie das sogenannte "shot-gun"-Verfahren.

Für das "shot-gun"-Verfahren wird ein DNA-Molekül in die entsprechenden Restriktionsfragmente zerlegt, und diese werden ohne Kenntnis ihrer Anordnung kloniert und sequenziert. Es werden Ansätze mit zwei verschiedenen Enzymen angelegt, so daß das Fragment in der Regel vollständig durch Subklone repräsentiert wird. Die Strategie der Sequenzierung ist in Abb.19 dargestellt. Es wurden folgende Subfragmente in den Bakteriophagen M13 (Messing, 1983) kloniert (vgl. Abb.19):

1. BamHI/PstI, ca. 400 bp, wurde in beiden Orientierungen kloniert, d.h. in die Vektoren M13mp18 und M13mp19, welche jeweils mit BamHI und PstI geschnitten worden waren;
2. PstI/BamHI, ca. 1600 bp, wurde
 - a) mit RsaI restrigiert und in mp18/SmaI kloniert;
 - b) mit Sau3A restringiert und in mp18/BamHI, sowie mp19/BamHI kloniert;
3. DraI/DraI, ca. 800 bp, wurde in mp18/SmaI kloniert, um die Überlappung zwischen 1. und 2. zu sequenzieren.

Der sequenzierte Bereich umfaßt 1980 bp und identifiziert nach Überprüfung aller 6 Leserahmen eine durchgängige Sequenz von 1014 bp (vgl. Abb.20). Unter der Voraussetzung, daß AUG als Startkodon verwendet wird, kann je nach Transkriptionsstart ein Protein von 314, 296 bzw. 269 AS gebildet werden.

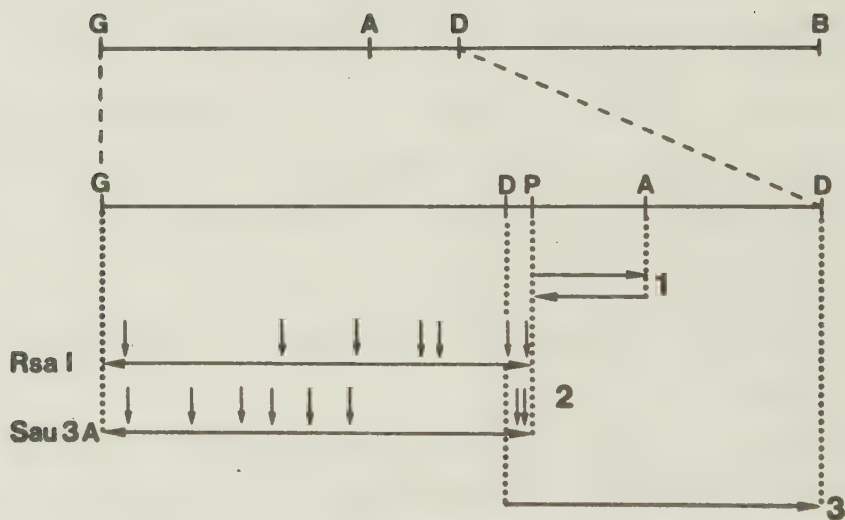


Abb.19: Strategie zur Bestimmung der Nukleotidsequenz des 2 kbp großen BglII/AccI-Fragmentes von N3; es waren drei Ansätze notwendig (1-3 vgl. Text). Die Karte zeigt die Lokalisation dieses Subfragmentes innerhalb des BglII/BamHI-Fragmentes (A=AccI; B=BamHI; D=DraI; G=BglII; P=PstI).

3
ATCTCTTGA~~AAAT~~AGCGCTGGCCATGCGTATAGGCTATCTTGAGACACCCGCGAGGGCTGAGGAGAGACGGCGGCGGC

83
TAATCTAGTACTTTGGGCGATCATTTAATACGTTTATTTACTGCTTATGAATGTAATATTTAACTTGTGCGTAATCAT

163
TAAACAAAGGTGAAAAATCACATTAACATCTCCCTACATTACTTTCGGTTTATCTTTTATATGTGTGAACTTTCCTC

243
TCTGCACAGGAAGTGGTGCATGCTTGATGCTCGGCTCCACCGGAAAACTAACTTGCGGCGGGGAATTGATCTTATCT

323
CCAGAGCAACCAATGTGGAAATGGCATGACACCCCCCACACAGTTCGCGCCAGTTTTTTTCAATGTGTGACACACC

403
CATACCCATAATGTTGCACGTGACAGGTTTGTATCACGTGCTTCTTAGGGTTTTGTTTATAGGCTAGACATTTTAGGGT

483
TTTTTTTTTCATCAAGTCTAGATCGTTTGTACGAACGATTGCTCCTTTTTCTTTTTTTTGTCTTTTTTTTTTATACTCA

563
CCGTTTACTGTCTTATGTCTCTCGAGAACTGGCGTGTGTGCTAACCAAGACTGGATCACCTTTACATAGCACTTATT

643
GCATTTCTTGGTGTTCGTACCCTACAATTGACAAAAGTAATTTTGTGTTCAATTTCTTCATCGATTCTTTCCTCTTTCA

723
ACAACCTCTCTTATTTTATCTTGGGATCGTAACGTCACCTAATTAAATCACGATTCCTCATATTGTTAACACCTCTTAAGGT

803
TTGCTGTAATATATTTATGTTATAAAAAGGATATT MET VAL GLU ASN SER SER SER ASN ASN SER
ATG GTA GAA AAC TCG TCG AGT AAT AAT TCA

873
THR ARG PRO ILE PRO ALA ILE PRO MET ASP LEU PRO ASP TYR GLU ALA LEU PRO THR HIS
ACA AGG CCA ATT CCA GCA ATA CCT ATG GAT CTA CCC GAT TAT GAG GCG CTC CCC ACC CAC

933
ALA PRO LEU TYR HIS GLN LEU ILE ALA GLY ALA PHE ALA GLY ILE MET GLU HIS SER VAL
GCG CCA TTG TAC CAT CAA CTT ATA GCG GGT GCA TTT GCT GGT ATA ATG GAA CAT TCA GTG

993
MET PHE PRO ILE ASP ALA LEU LYS THR ARG ILE GLN SER ALA ASN ALA LYS SER LEU SER
ATG TTC CCG ATA GAT GCC CTT AAG ACG CGA ATA CAA TCA GCC AAC GCG AAA TCG CTG TCT

1053
ALA LYS ASN MET LEU SER GLN ILE SER HIS ILE SER THR SER GLU GLY SER LEU ALA LEU
GCC AAG AAT ATG CTT TCG CAA ATA TCT CAC ATC TCT ACT TCC GAA GGA AGT CTA GCC CTA

1113
TRP LYS GLY VAL GLN SER VAL ILE LEU GLY ALA GLY LEU ALA HIS ALA VAL TYR PHE GLY
TGG AAG GGT GTT CAG TCT GTC ATA CTA GGT GCG GGA CTC GCG CAT GCA GTG TAT TTT GGT

1173
THR TYR GLU PHE CYS LYS LYS ASN LEU ILE ASP SER SER ASP THR GLN THR TYR HIS PRO
ACG TAT GAG TTC TGC AAA AAA AAT CTT ATC GAT TCG AGT GAT ACG CAA ACG TAC CAT CCT

1233
PHE LYS THR ALA ILE SER GLY ALA CYS ALA THR MET ALA SER ASP ALA LEU MET ASN PRO
TTT AAG ACA GCT ATT AGT GGT GCC TGT GCC ACC ATG GCA TCT GAC GCA TTA ATG AAC CCA

1293
PHE ASP THR ILE LYS GLN ARG ILE GLN LEU ASN THR SER ALA SER VAL TRP GLN THR THR
TTC GAC ACA ATA AAA CAG AGA ATC CAA CTC AAT ACC TCG GCA TCA GTA TGG CAA ACC ACA

1353
LYS GLN ILE TYR GLN SER GLU GLY LEU ALA ALA PHE TYR TYR SER TYR PRO ARG THR LEU
AAG CAG ATT TAC CAA TCT GAA GGT TTG GCA GCA TTT TAT TAT TCT TAC CCA AGG ACC CTA

1413
 VAL MET ASN ILE PRO PHE ALA ALA PHE ASN PHE VAL ILE TYR GLU SER SER THR LYS PHE
 GTA ATG AAC ATC CCA TTT GCA GCA TTT AAT TTC GTC ATA TAT GAA TCA TCC ACA AAA TTT

1473
 LEU ASN PRO SER ASN GLU TYR ASN PRO LEU ILE HIS CYS LEU CYS GLY SER ILE SER GLY
 TTA AAC CCA TCA AAT GAG TAC AAC CCC CTC ATA CAT TGT CTG TGT GGC AGT ATC AGC GGA

1533
 SER THR CYS ALA ALA ILE THR THR PRO LEU ASP CYS ILE LYS THR VAL LEU GLN ILE ARG
 TCG ACA TGT GCG GCG ATC ACA ACA CCT TTA GAC TGC ATA AAG ACA GTA CTG CAG ATA AAG

1593
 GLY SER GLN THR VAL SER LEU GLU ILE MET ARG LYS ALA ASP THR PHE SER LYS ALA ALA
 GGC AGT CAA ACA GTT TCG TTG GAA ATT ATG AGA AAG GCG GAT ACT TTT AGT AAA GCA GCC

1653
 SER ALA ILE TYR GLN VAL TYR GLY TRP LYS GLY PHE TRP ARG GLY TRP LYS PRO ARG ILE
 AGT GCC ATA TAT CAA GTT TAT GGC TGG AAA GGG TTT TGG AGA GGT TGG AAA CCA AAG ATA

1713
 VAL ALA ASN MET PRO ALA THR ALA ILE SER TRP THR ALA TYR GLU CYS ALA LYS HIS PHE
 GTG GCA AAC ATG CCG GCT ACT GCT ATA TCA TGG ACA GCT TAT GAA TGT GCA AAA CAT TTC

1773
 LEU MET THR TYR *** TTGGTCTTACATGTATATTATTTCCATTCTGTTTTGCATCTCAGAGATTATGTGTA
 CTA ATG ACG TAT TAG

1847
 TATTATCATTTTCCTGTTGTGACTTTATGTACATTATATATACAAATTTAATTTGATAATCCCAAGCTTGAGCTCTTT

1927
 CCCTCAACGAAAGTTTTTCATTTTTTCTTCATTACCTTTATATATCTATGTTTAGTTA

Abb.20: Nukleotidsequenz des BglII/AccI-Subfragmentes von N3. Die Proteinsequenz beginnt mit dem ersten AUG-Kodon des ORF; TATA- und TATA-ähnliche Elemente sind markiert.

Wie in letzter Zeit bekannt wurde, kann neben AUG, auch ACG bzw. UUG und AUA (bei Hefe) als Startkodon dienen (Zitomer et al., 1984; Anderson und Buzash-Pollert, 1985). Der Gebrauch von nicht-AUG-Kodons bedingt eine nur ineffiziente Initiationsrate, so daß durch die Wahl des Startkodons eine Regulationsmöglichkeit bezüglich der Translationsrate gegeben ist. Die Initiation der Translation hängt nicht nur vom Startkodon, sondern auch von den flankierenden Sequenzen ab.

Während bei Prokaryonten das Startkodon durch die stromaufwärts gelegene, sogenannte "Shine-Dalgarno"-Sequenz markiert ist (Shine

und Dalgarno, 1975), scheinen die eukaryontischen Signale weniger spezifisch zu sein, was zur Postulierung des "Scanning"-Modells führte (Kozak, 1981); nach diesem Modell wird an dem AUG-Kodon initiiert, das am nächsten zum 5'-Terminus liegt. Bei 90% der untersuchten Transkripte ist dies tatsächlich der Fall.

Gewisse Sequenzspezifitäten scheinen jedoch auch bei Eukaryonten vorhanden zu sein. Kozak (1981, 1986) zeigte, daß 99% aller untersuchten mRNA-Spezies ein Purin an Position -3 bzw. ein Guanin an Position +4 oder beides besitzen; d.h. in der Regel werden nur solche AUG-Kodons erkannt, die innerhalb der Consensussequenz A/GXXAUGG liegen, wobei ein A(75%), vor einem G(25%) an Position -3 deutlich bevorzugt ist. Bei stark exprimierten Spezies findet sich zusätzlich ein U an Position +6 (Dobson et al., 1982). Den Untersuchungen von Kozak (1982) ist zu entnehmen, daß beim Vorhandensein der optimalen Consensussequenz nahezu 100% der 40S-Untereinheiten das entsprechende AUG-Kodon erkennen; ist dies nicht der Fall, bindet nur ein gewisser Prozentsatz, was zu einer geringen Translationsrate führt.

Die AUG-Kodons im vorliegenden sequenzierten Protein liegen an den Positionen 840-843, 895-897 und 976-978. Die flankierenden Sequenzen lauten:

AUUAUGGGUA für das AUG-Kodon in Pos. 840-843

CCUAUGGGAU für das AUG-Kodon in Pos. 895-897

AUAAUGGGAU für das AUG-Kodon in Pos. 976-978

Das AUG-Kodon (Pos. 897) weist ein Pyrimidin in Position -3 auf und kommt daher als Startkodon wahrscheinlich nicht in Betracht. Das AUG-Kodon in Position 976 besitzt, wie das erste AUG-Kodon, die geforderten Nukleotide an den Positionen -3 und +4. Aufgrund

der optimalen Nukleotidsequenz (AXXAUGG) und der Lage am 5'-Ende sollte man annehmen, daß das AUG-Kodon an Position 840 als Start-kodon verwendet wird.

Für die Bestimmung von Initiationstellen für die Transkription gibt es bei Eukaryonten prinzipiell zwei Vorstellungen:

1. Die Transkription beginnt an einem speziellen Initiationselement;
2. Die Entfernung des Startpunktes für die Transkription ist wie bei *E. coli* durch Promotoren (-10- und -35-Sequenzen) vorgegeben;

Bei Eukaryonten sind die CAAT- und TATA-Sequenzen als Promotorelemente beschrieben. In *S. cerevisiae* wurden am 5'-Ende von allen sequenzierten, Protein-kodierenden Genen TATA-Elemente gefunden und deren Bedeutung nachgewiesen (Struhl, 1982; Guarente und Mason, 1983; Sciliano und Tatchell, 1984). Während bei den höheren Eukaryonten die TATA-Sequenzen in konstantem Abstand zur Initiationsstelle vorliegen (25-30 bp), variiert dieser bei *S. cerevisiae* (30-90 bp), und es finden sich mehrere TATA-Boxen oder TATA-ähnliche Sequenzen (Mc Neill und Smith, 1986). Die Untersuchungen von Chen und Struhl (1985) deuten darauf hin, daß zusätzlich Kontrollelemente in der Nähe der Initiationsregion vorhanden sind, die jedoch noch nicht genau definiert und lokalisiert sind.

In Tab.7 sind konservierte Sequenzen in 5'- und 3'-nicht-kodierenden Regionen aufgeführt. Das identifizierte Gen enthält Sequenzen, die bei Hefe und vielen, aber nicht allen eukaryontischen Promotoren konserviert sind. Bisläng ist noch nicht geklärt, ob alle diese Sequenzen in Hefe funktionell sind.

Im N3-Gen finden sich im 5'-flankierenden Bereich wiederholte Sequenzen von Pyrimidinen einerseits bzw. Purinen andererseits. Ausgedehnte Regionen solcher alternierender Sequenzen zeigen, daß die DNA dieser Region keine Protein-kodierende Funktion hat. Die CAAT-Sequenz, ein Promotorelement, das bei vielen Hefegenen fehlt, konnte auch im N3-Gen nicht identifiziert werden. Ein TATA-Element tritt in Position 822-828(1), TATA-ähnliche Sequenzen in den Positionen 811-817(2) und 731-737(3) auf. Da im sequenzierten, nicht-kodierenden 5'-Bereich (820 bp) keine weiteren TATA-Sequenzen vorhanden sind, scheint eine oder mehrere dieser TATA-Sequenzen funktionell sein. Die Abstände der TATA-Boxen 1 und 2 zum Startkodon 1 sind mit 12 bzw. 23 bp sehr gering, so daß möglicherweise TATA-Element 3 funktionell ist. Andererseits ist denkbar, daß die weiter 3'-liegenden AUG-Kodons benutzt werden. Dies würde allerdings dem "Scanning"-Modell widersprechen. Vermutlich kann erst nach der Analyse der Proteinsequenz, bzw. nach der Identifizierung der 3'- und 5'-Enden der entsprechenden mRNA durch die S1-Kartierung eine endgültige Entscheidung getroffen werden. Für die folgenden Betrachtungen wird das erste AUG-Kodon als Startkodon angesehen.

Tab.7: Consensus-Sequenzen im 5'- und 3'-nicht-kodierenden Bereich;

A. 5'-flankierende Region

	Position	N3	Position
1. 5'-TATAA/TAA/T-3' Transkriptions- initiation	-40 bis -200 ca. 30b vor dem Start der mRNA	TATAAAA(1) TATATTT(2) TATTTTA(3)	-19 - -13 -30 - -24 -111 - -104 vom 1.AUG
2. 5'-GGC/TCAATCT-3'	-130 bis -200 70-80 Nukleotide stromaufwärts	fehlend	
3. 5'-CT-Block(1050) -CAAG-3' (hohe Expression)	-37 bis -130	fehlend	
4. 5'-CAT/CACA-3'	-5 bis -25	fehlend	
5. "A" (40S-Bindungs- stelle)	-3	vorhanden	
6. "G" oder "A" (40S- Bindungsstelle)	+4	"G"	
7. "T" oder "C"	+6	fehlend	

B. 3'-flankierende Region

8. 5'-AATAAA-3' 5'-TAAATAAG/A-3'	10-30 b stromauf- wärts von der Poly- A-Additionsstelle	fehlend	
9. 5'-TATGT-3'	10-30 b stromauf- wärts von der Poly- A-Additionsstelle	5'-TATGT-3'	51-55 84-189 nach dem stop-K.
10. 5'-TTTTTATA-3' Kontrollelement für die Transkriptions- termination	50-90 b stromauf- wärts von der Transkriptions- termination	fehlend	
11. TAA TAG(1-140)..(T-reich)..TAG..TATGT..(T-reich)..TTT..(10-20)..PolyA TGA			

N3 vgl. Pos. 1786-1975;

Das Terminationssignal der höheren Eukaryonten, 5'-AATAAA-3', wird nur bei 25% der untersuchten Hefegene gefunden. Statt dessen wurde eine Prototypsequenz, 5'-TATGT-3', entdeckt, welche sich bei den überprüften Hefegenen ca. 30-40 bp vor der Polyadenylierungsstelle befindet (Zaret und Sherman, 1982; Bennetzen und Hall, 1982). Die Deletion dieser Sequenz führt bei den untersuchten Genen zu einer 50%-igen Reduktion des Proteins und seiner mRNA (Zaret und Sherman, 1982).

Beim N3-Gen findet sich die 5'-TATGT-3'-Sequenz an drei Stellen, an Pos. 1837-1841, Pos. 1870-1874 und Pos. 1871-1875, somit 51, 84 und 185 bp nach dem Stopkodon. Die auf das Stopkodon folgende Sequenz (Pos. 1786-1863) ist extrem T-reich (46%), die Sequenz zwischen Pos. 1875-1915 AT-reich (80%). Ein solcher Aufbau ist charakteristisch für die 3'- nicht-kodierende Region.

Das identifizierte Gen kodiert potentiell ein Protein von 35 kD. Ein Intron wurde innerhalb des N3-Gens nicht festgestellt, da die entsprechenden Erkennungssequenzen fehlen (Langford und Gailwitz, 1983). Das Protein ist stark basisch, von 314 AS sind 32 AS positiv geladen (10%), 19 AS negativ geladen (6%), wobei sich die positiv geladenen Reste am 3'-Ende häufen. Durch Summation der Molfraktionen von polaren AS nach der Methode von Capaldi und Vanderkoi (1972), wurde für das N3-Protein eine Polarität von 43% festgestellt. Die Polarität von 43% kennzeichnet das N3-Protein als lösliches Protein (Polarität 47+/-6%), da Membranproteine Werte von kleiner als 40% aufweisen.

In Tab.8 sind einige Charakteristika des N3-Proteins wiedergegeben, in Gegenüberstellung zu anderen Kerngenen, welche an mt-Spleißvorgängen beteiligt sind. Namentlich sind dies die Gene

CBP2 (Mc Graw und Tzagoloff, 1983), MIP1 (Kreike et al., Embo J., im Druck) und MSS51 (Faye und Simon, 1983).

Tab.8: Gegenüberstellung von N3 und drei anderen Kerngenen, die vermutlich am mt Spleißen beteiligt sind.

Kodongebrauch: angegeben ist die Anzahl der im hypothetischen Protein verwendeten Kodons bezogen auf die maximale Anzahl (61) von Kodons.

	N3	CBP2	MIP1	MSS51	
			1	2	
MG (kD)	35	74	41	27	51
AS	314	630	363	244	436
positiv geladene AS (%)	10	14	15	14	16
negativ geladene AS (%)	6	12	12	6	11
Kodongebrauch	58/61	60/61	59/61	59/61	58/61
spezifisch für Intron	bI1	bI5	bI3	bI3	
Polarität (%)	43				48

Auffällig erscheint in Tab.8, daß alle Proteine basisch sind. Typisch ist außerdem die Verwendung von seltenen Kodons, wie dies bei schwach exprimierten Genen der Fall ist (Bennetzen und Hall, 1982).

Unter der Annahme, daß das identifizierte Protein am mt Spleißprozeß direkt und nicht indirekt beteiligt ist, indem es etwa ein anderes Protein modifiziert, das eine Funktion bei der mRNA-Reifung besitzt, ist davon auszugehen, daß das Protein über zwei mt Membranen in die Mitochondrien transportiert werden muß.

Mehr als 90% aller mt Proteine sind im Kern kodiert, werden im Cytoplasma synthetisiert und auf noch unbekannte Weise in eines der vier mt Kompartimente, mt Matrixraum, innere Membran, Inter-

membranbereich und äußere Membran, dirigiert.

Einige dieser Proteine werden als Präkursoren mit Amino-terminalen Extensionen synthetisiert, welche durch einen proteolytischen Schnitt während oder nach dem Transfer in die Mitochondrien in das reife Protein übergeführt werden (Schatz und Butow, 1983; Hay et al., 1984). Diese Präsequenzen können zwischen 10 und 60 bp variieren. Bisher ist wenig über die Primärstruktur mitochondrialer "leader"-Sequenzen bekannt; im Gegensatz zu Chloroplasten-Proteinen scheinen diese keine gemeinsamen, konservierten AS-Sequenzen zu besitzen (Karlin-Neumann und Tobin, 1986). Selbst Proteine mit gleicher Funktion, wie die tRNA-Synthetasen, weisen keine konservierte "leader"-Struktur auf, wie es die Gegenüberstellung der ersten 30 AS von 5 tRNA-Synthetasen beweist (Tzagoloff et al., 1985). Versuche, wobei "leader"-Sequenzen mit nicht-mitochondrialen Genen fusioniert wurden, zeigen, daß diese in der Lage sind, die entsprechenden Genprodukte in die Mitochondrien zu dirigieren (Hurt et al., 1984). Die bekannten Präsequenzen sind stark basisch, reich an Threonin und Serin und somit hydrophiler als das "mature" Protein. Teilweise enthalten sie lange Sequenzen von ungeladenen AS, welche mit Membranen überspannen können (Schatz, 1983). Im N3-Gen ist in den ersten 60 AS der Serin/Threonin-Gehalt nicht signifikant erhöht, die Ladung ist ausgeglichen. Lange, nicht unterbrochene Sequenzen von hydrophoben AS sind nicht vorhanden. Die Polarität in den ersten 20 AS beträgt nach Capaldi und Vanderkoi 55% (43% für das Gesamtprotein). Eine Häufung von positiv geladenen AS findet sich stromabwärts vom 3. AUG-Kodon, zwischen den AS 46 bis 96, wo der Threonin/Serin-Gehalt 22% beträgt, und in den letzten 70 AS des Proteins, wo 10

positiv geladene AS 3 negativ geladenen gegenüberstehen.

Es kann also bislang nichts über die Existenz eines "leader"-Peptids ausgesagt werden. Eine wesentliche Voraussetzung für die Klärung dieser Frage ist die eindeutige Festlegung des Translationsstartes.

Zur Klärung der Identität des isolierten Gens wurde ein Computervergleich mit einer Genbank unternommen. Die verwendete Genbank repräsentiert 4 Millionen bp, darunter 120 Hefegene. Es konnten keine Homologien zu einem der vertretenen Gene festgestellt werden, u.a. Komponenten des mit Translationsapparates, wie tRNA-Synthetasen oder ribosomale Proteine. Auch mit CBP2 und MIP1, Kernproteinen, die am Spleißen von bI5 bzw. bI3 beteiligt sind, wurde keine homologe Sequenz festgestellt.

3.6 "Gene-Disruption"

Durch ein "Gene-Disruption"-Experiment konnte in Zusammenarbeit mit T. Söllner (Diplomarbeit, in Vorbereitung) bestätigt werden, daß der durch die Sequenzanalyse identifizierte ORF eine Voraussetzung für die Suppression ist. Zu diesem Zweck wurde in den N3-Genbereich eine Deletion eingeführt. Nach Umklonierung in einen geeigneten Vektor ohne Schnittstelle für ClaI (puC8) wurde das 490 bp große ClaI/ClaI-Fragment, welches Promotorsequenzen und den 5'-kodierenden Bereich des N3-Gens umfaßt, eliminiert und durch das LEU2-Gen tragende BglII-Fragment aus dem Vektor YEp13 ersetzt (Abb.21). Nach Reklonierung des so manipulierten Fragmentes in den Vektor YEp13 erfolgte die Transformation des Empfängerstammes AH215 (M1301). Pro µg DNA wurden 10^5 LEU⁺-Transformanten erhalten, die auf Glycerin nicht wachsen konnten.

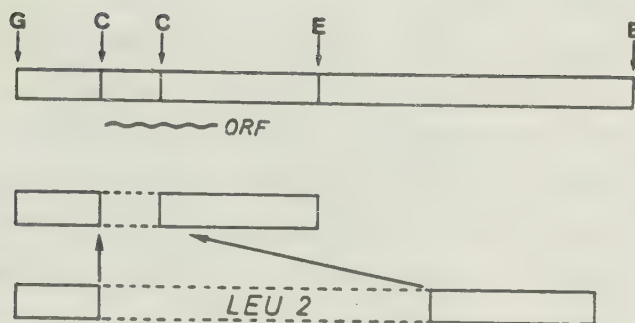


Abb.21: "Gene-Disruption"-Experiment. Das 490 bp große *Cla*I/*Cla*I-Fragment, welches 430 bp des ORF von N3 enthält wurde exzidiert und durch das *LEU2*-Fragment aus dem YEp13 ersetzt (B=*Bam*HI; C=*Cla*I; E=*Eco*RI; G=*Bgl* II);

Die Reisolation des Plasmids aus solchen Transformanten zeigte, daß sie das oben konstruierte Plasmid mit der deletierten N3-Kopie trugen. Der *LEU*⁺-Phänotyp ging unter nicht-selektiven Bedingungen verloren, so daß keine chromosomal integrierten Transformanten erhalten worden waren. Mit der Deletion des *Cla*I-Fragmentes wurde somit ein für die Suppression funktioneller Bereich des Gens betroffen. Die Sequenzdaten stehen in Übereinstimmung mit diesem Befund, da durch die eingeführte Deletion das Protein um 120 AS verkürzt wurde.

3.8 Bestimmung der Kopienzahl

Die Untersuchung, ob das klonierte Gen durch eine einzige Sequenz im *S. cerevisiae* Genom repräsentiert wird, erfolgte über ein Southern-Experiment. Ein 1,1 kbp großes *Hae*III/*Acc*I-Fragment, welches den gesamten kodierenden Bereich des N3-Gens einschließt,

wurde radioaktiv markiert und gegen die DNA genomischer ClaI-, DraI-, BamHI- und BglII-Fragmente (Stamm R101) hybridisiert. Als Marker diente mit EcoRI-geschnittene P22-DNA, welche mit Hilfe der Klenow-Polymerase endmarkiert worden war. Die erwarteten Fragmente für ClaI (490 bp, >3850 bp), DraI (1330 bp, 800 bp), BamHI (6850 bp) und BglII (>5100 bp) konnten nachgewiesen werden (vgl. Abb.22). Für den DraI-Ansatz ist auf dem Autoradiogramm eine schwächere Bande mit ca. 5 kbp sichtbar, die wahrscheinlich auf eine partiell restringierte Bande zurückzuführen ist. Das Ergebnis dieses "Southernblots" läßt vermuten, daß das N3-Allel in nur einer Kopie pro Genom vorliegt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß identische Fragmente, die einen größeren Bereich umfassen, dupliziert sind, oder aber, daß duplizierte Sequenzen mit ähnlicher Funktion so stark divergiert sind, so daß sie sich durch die Hybridisierung nicht nachweisen lassen.

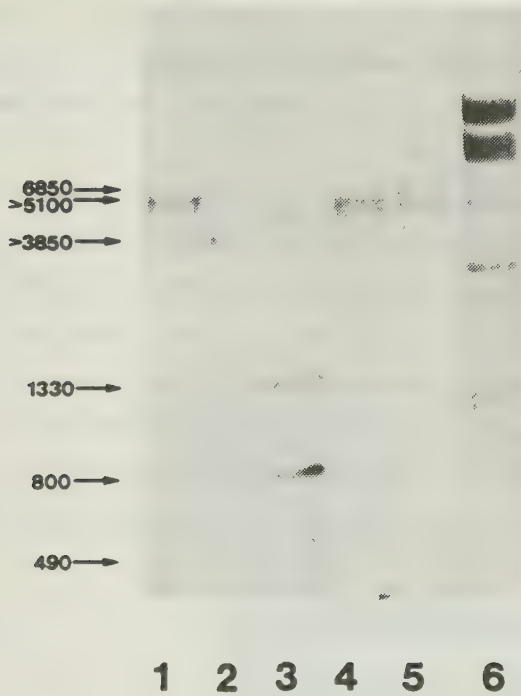


Abb.22: Southern-Hybridisierung genomischer DNA mit einer N3-spezifischen Probe. Die Restriktion erfolgte mit BglII (1 und 4), ClaI(2), DraI(3), und BamHI(5); als Marker diente P22 x EcoRI(6).

3.8 Zuordnung des isolierten Fragmentes zu einem Chromosom

Die Kartierung des klonierten Fragmentes erfolgte durch den Nachweis der Hybridisierung mit dem entsprechenden Chromosom. Chromosomen von *S. cerevisiae* lassen sich nach einer Methode von Carle

und Olson (1985) in Agarosegelen auftrennen (OFAGE: "orthogonal field alternation gel electrophoresis"). Hefechromosomen besitzen eine Größe zwischen 500 und 1000 kbp und haben in Gegenwart zweier verschieden gepolter, orthogonal zueinanderliegender elektrischer Felder unterschiedliche elektrophoretische Mobilität (entsprechend ihrer Größe).

Die Chromosomen-DNA wird aus Hefesphäroplasten gewonnen, welche in Agarose eingebettet werden, so daß die Intaktheit der Hefechromosomen gewährleistet ist. Durch die Auftrennung im elektrischen Feld ist es möglich, einen elektrophoretischen Karyotyp zu erhalten, wobei die 17 Chromosomen von *S. cerevisiae* durch 13 Banden, 9 Einzelbanden und 3 Doppelbanden repräsentiert sind. In Abb.23 ist der Karyotyp des Stammes VB220A dargestellt, der für diese Untersuchungen von D. Jäger (Basel) zur Verfügung gestellt wurde.

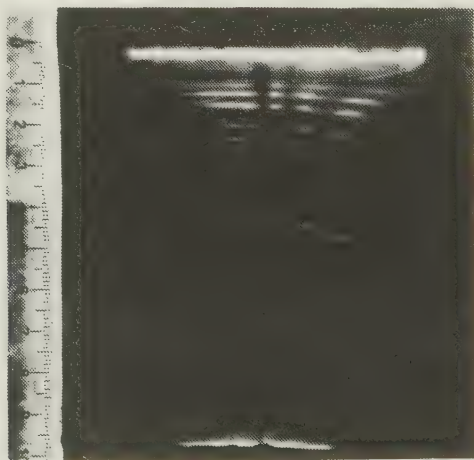


Abb.23: Darstellung des elektrophoretisch aufgetrennten Karyotyps von *S. cerevisiae*; gezeigt ist das Photo eines mit EB angefärbten Gels.

Chromosom 12, das einen Großteil der rRNA-Gene trägt, zeigt ein anomales Verhalten, indem es nicht aus der Geltasche wandert. Chromosom 17 ist bislang noch nicht identifiziert, da keine Hybridisierungsprobe zur Verfügung steht.

Der dargestellte Chromosomen-"Blot" wurde mit einer Probe des nicktranslatierten BglII/AccI-Fragmentes (2 kbp) hybridisiert (Abb.24). Auf dem Autoradiogramm ist nur eine Bande in Höhe von Chromosom 10 sichtbar, welche das klonierte Fragment und somit das N3-Allel Chromosom 10 zuordnet.

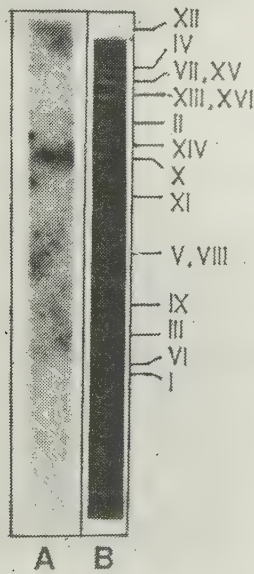


Abb.24: Kartierung des klonierten Fragmentes; durch den Vergleich mit dem Karyotyp von *S. cerevisiae* (B) wurde das N3-Allel auf Chromosom 10 lokalisiert (A).

3.9 Transkriptstudien

Die Frage, ob das Gen transkribiert wird, ließ sich durch ein Northern-Experiment klären. Die Gesamt-RNA einer episomalen Transformante und des nicht transformierten isogenischen Stammes wurde nach der Methode von Carlson und Botstein (1982) isoliert. Nach Denaturierung der RNA mit Glyoxal erfolgte die Auftrennung auf einem 1,5%-igen Agarosegel. Für die Hybridisierung wurden zwei nick-translatierte Fragmente verwendet (siehe Abb.16), das ClaI/ClaI-Fragment mit 490 bp und das BglII/AccI-Fragment mit einer Größe von 1980 bp. Mit Hilfe der ribosomalen RNA-Banden von 18S und 28S, welche nach EB-Färbung sichtbar wurden, konnte der im Northern erkennbaren Bande eine Größe von ca. 1100 b zugeordnet werden. Für den nicht transformierten Stamm ist in Höhe dieser Bande ein schwaches Signal zu erkennen. Der Unterschied in der RNA-Menge mag auf die Tatsache zurückzuführen sein, daß die Transformante mit dem N3-Gen auf einem "Multi-copy"-Plasmid eine sehr viel höhere Dosis des N3-Gens besitzt als der WT. Die Länge des Transkriptes stimmt in etwa mit dem aufgrund der Sequenzdaten erwarteten Wert überein.

IV. DISKUSSION

1. Zielsetzung

Das Intron 1 von Apocytochrom b ist aufgrund seiner potentiellen Sekundärstruktur als ein Klasse II-Intron charakterisiert. Durch Arbeiten von Schmelzer et al. (1982, 1983) sind einige in *trans* nicht komplementierbare *cis*-aktive Mutationen bekannt, welche im wesentlichen drei Sequenzbereiche im Intron markieren. Der Spleißdefekt dieser Mutanten scheint aus mutativen Veränderungen in Erkennungsstrukturen zu resultieren, die für das RNA-Spleißen essentiell sind.

Neben bII gehören zu der beschriebenen Klasse II weitere 8 mitochondriale Introns, zusätzlich 4 Introns in den Chloroplasten von höheren Pflanzen und 6 Introns in den Chloroplasten von *Euglena gracilis* (Keller und Michel, 1985; Lang et al., 1985). Introns von Mosaikgenen im Kern sind bislang in dieser Klasse nicht vertreten. Die Klasse II-Introns sind nicht nur durch eine spezifische Sekundärstruktur, bestehend aus 6 "Stems", sondern auch in geringem Maß durch Consensus-Sequenzen charakterisiert. Konservierte Sequenzen finden sich insbesondere an den 5'- und 3'-Exon/Intron-Übergängen, daneben in einem 14b umfassenden "Hairpin" innerhalb der letzten 100 3'-seitigen Basen (Stamm 5 bei Intron bII) und in einer 8 Basen langen Sequenz, die bei verschiedenen Introns an unterschiedlichen Positionen auftritt. Interessanterweise liegt letztere im hier studierten bII nur 8 Basen von der Mutation M1301 entfernt (vgl. mit Abb.5). Diese Mutante war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

Durch die Analyse von Revertanten, bei denen durch kompensatorische Mutationen oder durch echte Rückmutationen der Spleißdefekt der Mutante M1301 aufgehoben war, wurden zwei Zielsetzungen verfolgt:

- Die Identifizierung von mt Revertanten diente zur Charakterisierung der Natur von Spleißsignalen (Kap. 2); daneben zur Überprüfung, ob der Spleißdefekt von M1301 tatsächlich auf der identifizierten Mutation beruht.
- Durch den Nachweis der Beteiligung von Kernprodukten an der Exzision von bII wurde eine Bestätigung der engen Kooperation zwischen dem Zellkern und den Mitochondrien auch für Funktionen des mitochondrialen RNA-"Processings" erbracht (Kap. 3).

Die Mitwirkung von Kern-kodierten Proteinen bei der Exzision von bII aus COB-Transkripten schien aus folgenden Gründen gegeben:

a) bII besitzt keinen ORF, während einige Introns derselben Klasse eine potentiell Protein-kodierende Sequenz aufweisen und für einen Vertreter dieser Klasse (aII) die Beteiligung einer selbstkodierten "RNA-Maturase" am Spleißen nachgewiesen ist (Carignani et al., 1983).

b) Für Cytochrom b existiert ein Spleiß-"Pathway" in der Art, daß die Exzision von bII aus dem COB-Transkript vor weiteren Intron-exzisionen bevorzugt ist (Schmelzer, 1981). Der erste Schritt im RNA-"Processing" könnte ein wichtiger Ansatzpunkt für kernkodierte Faktoren sein, die regulatorisch eingreifen.

c) Durch die bII-Mutationen M4873 und M1301, wird die Stabilität der Sekundärstruktur im Gegensatz zu vielen anderen cis-aktiven Mutationen nicht vermindert (Schmelzer, 1982, 1983). Da diesen

Sequenzen also primär keine Funktion bei der Bildung von intramolekularen Duplexstrukturen zukommt, stellte sich die Frage, ob sie als Erkennungssignale für Proteine dienen.

2. Mt Revertanten

Unter den isolierten mt Revertanten zu M1301 ließen sich zwei verschiedene Klassen von Suppressormutationen identifizieren.

Von sechs sequenzierten Revertanten zu M1301 (Deletion von -1A in einer Serie von 5A) wurden drei gefunden, in denen die WT-Sequenz durch eine +1A-Insertion wiederhergestellt war. Diese Revertanten zeigen, daß die früher als -1A-Deletion identifizierte Mutation M1301 (Schmelzer et al., 1983) allein für den Spleißdefekt verantwortlich ist, daß also keine zusätzliche Mutation vorliegt.

Drei andere Revertanten, sogenannte Pseudo-WT-Revertanten, waren durch eine +1G-Insertion an Position 507 entstanden. Diese Revertanten sind funktionell vom WT nicht zu unterscheiden, d.h. sie erlauben die Exzision von bII mit ähnlicher oder identischer Effizienz wie der WT. Der temperatursensitive Phänotyp der Revertanten war in allen Fällen auf nicht gekoppelte, unabhängig entstandene Mutationen zurückzuführen. Obwohl durch die Auswahl von temperatursensitiven Revertanten solche mit nicht-WT-Charakter selektiert werden sollten, konnten alle sechs Revertanten der einen (5'-AAAAA-3') oder der anderen Gruppe (5'-AAAAG-3') zugeordnet werden. Keines der vielen möglichen Pentanukleotide, die durch Insertion einer beliebigen Base innerhalb der ungepaarten Sequenz 5'-AAAA-3' entstehen könnte, wurde isoliert. Dies kann nur bedeuten, daß keine anderen als die Basenfolgen 5'-AAAAA-3' und 5'-AAAAG-3' die Exzision von bII ermöglichen.

"Second-site"-Suppressoren, wie zu einigen Mutationen in Klasse I-Introns gefunden, wurden nicht entdeckt (Weiss-Brummer et al., 1983; Holl et al., 1985). Das Fehlen von anderen mit Revertanten ist im Einklang mit der Hypothese, daß die Erhaltung der Primärsequenz per se für die Exzision von Intron 1 notwendig ist. Zur anderen bI1-Mutante, M4873, die durch eine Vergrößerung eines konservierten "Loops" in Stamm 6 gekennzeichnet ist (vgl. Abb.5), konnten ebenfalls keine "Second-site"-Suppressoren gefunden werden; die isolierten Revertanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen, nämlich in WT-Revertanten sowie Pseudo-WT-Revertanten. Letztere haben die -1bp-Deletion konserviert, weisen aber eine veränderte Sequenz durch die Transition eines A neben der Serie von 5G auf (Schmelzer et al., 1982). Durch diesen Reversionstyp wird der konservierte "Mini-Loop" in Originalgröße wiederhergestellt, ohne daß die Heteroduplexstruktur beeinträchtigt wird. Wie bei M1301 betrifft die Mutation eine "Loop"-Struktur. Solche Strukturen könnten bei Protein/RNA-Interaktionen beteiligt sein (vgl. Kap. 4.5). Besonders interessant ist, daß der durch M4873 gekennzeichnete "Miniloop", einen Bereich umfaßt, der an der Bildung des "Branchpoints" beteiligt ist.

Die meisten cis-aktiven Mutationen von Klasse I-Introns betreffen hybride Sequenzbereiche; die Mutationen von zwei bI3-Mutanten, M811, M181 liegen dagegen in ungepaarten Sequenzen, ähnlich wie die oben beschriebenen bI1-Mutationen (Holl et al., 1985). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß auch zu den Mutanten M811 und M181 keine "Second-site"-Suppressormutationen gefunden wurden, wohl aber ein Kern-kodierter Suppressor zu M811. Dies mag als Hinweis auf die Beteiligung eines kernkodierten Proteins beim

Spleißen von Klasse I-Introns gelten.

Der Effekt der Mutationen von M1301 und M4873 auf das mt RNA-Spleißen wurde nicht nur in vivo, sondern auch in vitro in einem "Self-Splicing"-System nachgewiesen (Schmelzer und Schweyen, 1986). M1301 verursacht eine starke Reduktion der b11-Autoexzision, während M4873 das "Selfsplicing" vollständig blockiert. Interessanterweise verhalten sich die Mutanten M1301 und M4873 in vivo genau umgekehrt: M4873 weist eine nur partielle Inhibition des "Splicing" auf - M1301 zeigt einen im gesamten Temperaturbereich stringenten Defektphänotyp. Dies könnte bedeuten, daß M1301 neben dem im in vitro-Ansatz sichtbar werdenden Einfluß auf die Exzision von b11, noch weitere Funktionen in vivo beeinträchtigt. Es ist deshalb anzunehmen, daß diese Sequenz eine komplexe Bedeutung besitzt.

Die Sequenzanalyse von mt Mutanten diente zur Charakterisierung von wichtigen cis-aktiven Bereichen; die Analyse von Revertanten bestätigte die Relevanz solcher Bereiche. Die Möglichkeit, die Spleißreaktion in vitro zu untersuchen, erlaubt die Identifizierung weiterer essentieller Strukturelemente für das RNA-Spleißen (Schmelzer und Schweyen, 1986). Gegenüber der in vitro-Mutagenese hat die genetische Analyse von Revertanten jedoch den Vorteil, daß sie die Situation in vivo reflektiert. Es ist denkbar, daß alternative Spleißstrukturen existieren, die in vitro charakterisierte muß nicht notwendigerweise die in vivo funktionelle Sekundärstruktur darstellen.

3. Introndeletion

Der RNA-"Processing"-Defekt der mt Mutante M1301 läßt sich durch die Deletion von bI1 auf DNA-Ebene heilen. Die Sequenzierung der Revertante RU1 ergab, daß die Exzision basengenau erfolgt war, somit das 3'-Ende von Exon 1 direkt an das 5'-Ende von Exon 2 grenzte. Ein Wachstumsnachteil, resultierend aus dem Verlust des Intron bI1, war bei dieser Mutante nicht gegeben. Untersuchungen einer großen Anzahl von Intron-deletierten Revertanten von M1301 zeigten, daß sich die Deletionen in keinem Fall nur auf Teile von bI1 beschränkten oder daß an den Deletionsgrenzen Mutationen aufgetreten waren (Gargouri et al., 1983; S. Classen, pers. Mittlg.). Einschränkend ist dazu jedoch anzumerken, daß nur solche "fehlerhaften" Deletionen zu isolieren wären, welche die Bildung eines funktionsfähigen Apocytochrom b erlauben. Deletionsmutanten, bei denen der Leseraster verschoben ist, bleiben vermutlich atmungsdefekt und können bei der Isolierung von Revertanten zu M1301 nicht gefunden werden.

Bei *Podospira anserina* wurden zum ersten Mal nicht exakte Intron-exzisionen auf DNA-Ebene nachgewiesen. Bei diesem Organismus ist die Seneszenz mit dem Auftreten Seneszenz-spezifischer DNA verbunden, die aus der Amplifikation bestimmter mitochondrialer Regionen resultiert; der am häufigsten amplifizierte Bereich entspricht dem ersten Intron im OXI3-Gen (Belcour et al., 1982; Vierny et al., 1982). Belcour und Vierny (1986) zeigten am Beispiel von drei Mutanten, daß das erste Intron des OXI3-Gens nur ungenau eliminiert wurde, so daß zwar der größte Teil des Introns deletiert war, Bereiche an den Deletionsgrenzen jedoch verändert waren.

Introndeletionen bei *S. cerevisiae* sind nicht nur bei Revertanten von M1301 nachgewiesen. Dieser Reversionsmechanismus scheint allgemeiner Natur zu sein; er wurde ausgehend von Mutationen in b11, b12 und b13 (in *cis*- und *trans*-aktiven Elementen), ferner bei *Schizosaccharomyces pombe* nachgewiesen (Gargouri et al., 1983; A-M. Merlos-Lange, pers. Mittlg.).

Die Frequenz (10^{-7} - 10^{-9}), mit der solche Introndeletionen auftreten, insbesondere die Existenz von exakten Deletionen mehrerer Introns gleichzeitig beweist, daß es einen Mechanismus für die Exzision von Intronsequenzen geben muß. Es werden drei Hypothesen (Abb. 25) diskutiert, die eine Erklärung für dieses Phänomen bieten könnten (vgl. Gargouri et al., 1983):

1. DNA-DNA-Rekombination

Die Deletion des oder der Introns erfolgt durch einen Rekombinationsprozeß zwischen cDNA und DNA. Als "template" für die cDNA-Synthese dient der Reversen Transkriptase eine reife mRNA oder eine partiell gespaltene Prä-mRNA. Ein solcher Mechanismus wurde bei höheren Eukaryonten nachgewiesen, wo er jedoch häufig zur Bildung von Pseudogenen, anstelle von funktionellen WT-Genen führt (Wilde et al., 1982). Bislang konnte eine Reverse Transkriptase in Hefe-Mitochondrien nicht isoliert werden, obwohl signifikante Sequenzhomologien einiger offener Leserahmen von Klasse II-Introns mit der Reversen Transkriptase von Retroviren beschrieben sind (Michel und Lang, 1985).

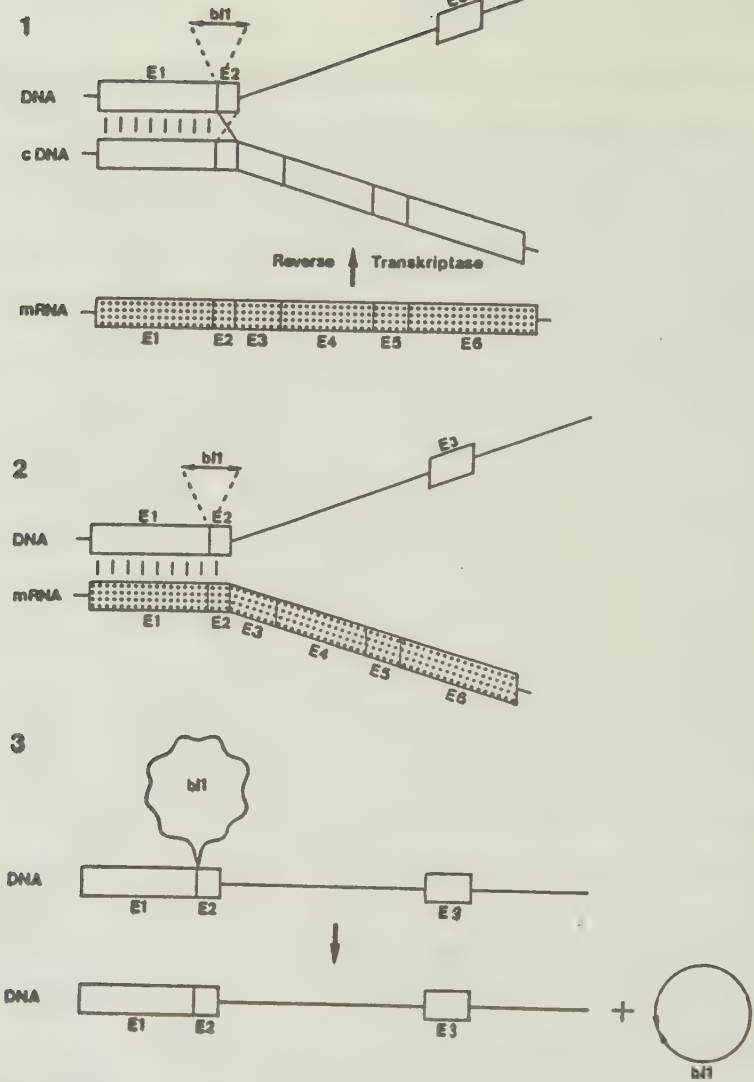


Abb.25: Darstellung möglicher Mechanismen, die zur Introndeletion auf DNA-Ebene führen können:

1. Synthese der cDNA durch die Reverse Transkriptase und nachfolgende Rekombination zwischen cDNA und DNA mit dem Ergebnis der Intronexzision;

2. Hybrid-Bildung zwischen DNA und mRNA bzw. partiell gespleißter Prä-mRNA; die nicht gepaarte Intronsequenz wird unter Mitwirkung von Komponenten des Rekombinations- oder Spleißsystems exzidiert;

3. Deletion von Introns, die per se die Fähigkeit zur Autoexzision bzw. Transposition besitzen.

Abbildung verändert nach Classen, 1986

2. Hybridbildung zwischen DNA und RNA

Die Deletion von DNA-Sequenzen erfolgt an einer Heteroduplex-Struktur, bestehend aus mt DNA und reifer mRNA bzw. partiell gespleißter Prä-mRNA, in der die Intronsequenz ungepaart bleibt. Die entsprechenden Enzyme können durch das DNA-Rekombinationssystem und/oder das RNA-Spleißsystem, einschließlich der Maturasen gestellt werden.

3. Transposition

Analog zu transponierbaren genetischen Elementen besitzt die Intron-DNA die Eigenschaften der Auto-Exzision und Transposition.

Die letzte Hypothese ist unwahrscheinlich, da den Introns die charakteristischen Sequenzen, welche bei Transposons an den Enden gefunden werden ("direct" oder "inverted repeats"), fehlen. Andererseits ist nachgewiesen, daß bei verschiedenen Spezies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*) Introns in homologen Genbereichen an derselben Stelle inseriert sind. Die entsprechenden Introns müssen nicht homolog sein; bei einigen finden sich in den 5'-Intronbereichen Übereinstimmungen der Primär- und Sekundärstruktur (Lang et al., 1984; Trinkl und Wolf, Gene, im Druck). Diese Ergebnisse lassen eine große Mobilität mt Introns vermuten.

Für die Mechanismen 1 und 2 ist als Voraussetzung gefordert, daß zu einem geringen Anteil die Prä-mRNA auch in spleißdefekten Stämmen prozessiert werden kann. Eine Vorhersage dieses Modells wäre, daß von einigen, hinsichtlich der Intron-Exzision stringenten Mutanten, keine intronlosen Revertanten isoliert werden können. Die RNA/DNA- und DNA/DNA-Rekombination würde erklären,

daß die Deletion von mehreren Introns häufig gefunden wird. Voraussetzung für multiple Deletionen ist, daß alle Introns zumindest mit einer geringen Effizienz auf der RNA-Ebene exzisiert werden können.

Viele mt Introns sind "optional", d.h. sie sind in einigen Stämmen vorhanden, fehlen jedoch in anderen. Optionale Introns sind bei verschiedenen Spezies, bei *S. cerevisiae* (Nobrega und Tzagoloff, 1980), *Neurospora crassa* (Burger und Werner, 1983), bei *A. nidulans* (Waring et al., 1984) und bei *S.pombe* (Lang et al., 1984; Trinkl et al., 1985) beschrieben. Die An- oder Abwesenheit dieser Introns bewirkt jedoch keine phänotypischen Unterschiede zwischen den WT-Stämmen.

Introns, ursprüngliche Elemente der evolutionären Entwicklung, waren vermutlich ubiquitär vertreten. In manchen Systemen sind sie heute noch präsent, in anderen im Verlauf der Evolution verloren gegangen. Diese Entwicklung scheint, nachweisbar durch die Induktion intronloser Revertanten, noch nicht abgeschlossen. Ein Selektionsvorteil ist durch die Anwesenheit von Introns wahrscheinlich nicht gegeben. Das steht im Einklang mit den Befunden, daß Introns bevorzugt dann erhalten blieben, wenn Intron-spezifische Funktionen vorhanden sind. Die Intron-kodierten "RNA-Maturationen", an der Exzision der entsprechenden Introns beteiligt, sind neben Proteinen mit anderer Spezifität (vgl. Kap.4.1) Beispiele dafür.

Die beschriebenen stammbhängigen Unterschiede in der Frequenz der Reversion von M1301 durch Introndeletion (vgl. Kap.2.3.2) geben einen Hinweis darauf, daß neben Intron-kodierten Proteinen, bestimmte Kernfaktoren einen Einfluß auf die Intronstabilität

besitzen müssen. Bei den Stämmen AH215(AH216) ist die Introndeletion um zwei Zehnerpotenzen gegenüber IC8(IC11) erhöht. Diese Differenz könnte auf der Beteiligung von einem oder mehreren Kernfaktor(en) am DNA-Spleißen beruhen. Die Charakterisierung solcher Kerngene gibt möglicherweise Aufschluß über den Mechanismus der Introndeletion auf DNA-Ebene.

4. Proteine und RNA-Spleißen

Für jeweils einige Mitglieder der Klasse I- und der Klasse II-Introns wurde in vitro "Selfsplicing" nachgewiesen. Es ist denkbar, daß die dem "Selfsplicing" zugrunde liegende RNA-Katalyse auch in vivo wirksam ist. Gleichzeitig aber gibt es genetische Daten, welche die Beteiligung von Proteinen am RNA-Spleißen in vivo eindeutig belegen (Lazowska et al., 1980; Weiss-Brummer et al., 1982; Dieckmann et al., 1982; Faye und Simon, 1983; Pillar et al., 1983). Es bleibt also die Frage, welcher Art diese Beteiligung ist.

4.1 "RNA-Maturasasen" und andere Intron-kodierte Proteine

Die Mitwirkung von Intron-kodierten Proteinen, den "RNA-Maturasasen", die von einigen mit Introns kodiert sind, ist bekannt. In den Hefemitochondrien wurde für die Exzision von drei Introns die Notwendigkeit der entsprechenden "RNA-Maturasasen" nachgewiesen, nämlich für bI2 und bI4 (Klasse I) (Lazowska et al., 1980; Anziano et al., 1982; De la Salle et al., 1982; Weiss-Brummer et al., 1982; Jacq et al., 1984) sowie für aI1 (Klasse II) (Carignani et al., 1983).

Wegen der geringen Expressionsrate und eines fehlenden Selektionssystems, ist jedoch wenig über die Funktion der "RNA-Maturasasen" bekannt. Die Klonierung der betreffenden Leserahmen in *E. coli*, die damit verbundene hohe Expressionsrate, sowie die Verwendung von Antikörpern, sollten in der nächsten Zeit, insbesondere für die bI4-Maturase, Erfolge in der Aufklärung der funktionellen Bedeutung bringen (Delahodde et al., 1985).

Die erste biochemische Aktivität, die für einen Intron-kodierten ORF nachgewiesen werden konnte, war die spezifische Endonuklease- bzw. Transposaseaktivität des ORF in der 21S-rRNA, einem Klasse I-Intron (Dujon et al., 1985; Macreadie et al., 1985). Dieses Protein sorgt für die Insertion des Introns in intronlose rRNA-Stämme (Dujon et al., 1974); ein Grund für die "Intronkonservierung" ist nicht bekannt. Interessanterweise ist in diesen Fall die Exzision des Introns nicht von der Intron-kodierten Funktion abhängig. Das "Processing" kann in rho⁻-Stämmen erfolgen und ist somit unabhängig von mit synthetisierten Proteinen. Der ORF der 21S-rRNA besitzt strukturelle Homologien zu den Maturase-kodierenden Bereichen der Klasse I-Introns, so daß evtl. auch eine funktionelle Verwandtschaft in Erwägung zu ziehen ist.

Die Arbeiten von Michel und Lang (1985) zeigen, daß die Introns a11 und a12 Homologie mit Reversen Transkriptasen besitzen. Dies ist ein zweiter Hinweis für eine Funktion, die nicht im Bereich des RNA-Spleißens liegt.

Ein drittes Beispiel ist von Kotylak et al. (1985) beschrieben. Für bI4 gibt es experimentelle Daten, daß der Leserahmen möglicherweise gemeinsam mit 5'-Exonanteilen, eine DNA-Rekombinase-Aktivität besitzen könnte. Dieses Enzym arbeitet auf DNA-Ebene und induziert die genetische Rekombination zwischen homologen Exons.

Aus den aufgeführten Beispielen ist ersichtlich, daß die ORFs innerhalb der Intronsequenzen vermutlich nicht nur mit RNA, sondern auch mit DNA interagieren können; einige dürften überhaupt keine Aktivität beim RNA-Spleißen besitzen. Daher wird die Hypothese diskutiert, daß Intron-kodierte Proteine in erster

Linie für die Intron-Selbsterhaltung vorhanden sind und dem zufälligen Intronverlust entgegen wirken (Dujon et al., 1985; Kotylak et al., 1985). Möglicherweise repräsentieren die Intron-kodierten Proteine Relikte von primordialen Proteinen, die mit beiden Nukleinsäure-Typen interagieren konnten.

4.2 Kernproteine

Die Beteiligung von Kern-kodierten Proteinen am mt RNA-Spleißen ist durch die Existenz von *pet*⁻-Mutanten nachgewiesen. *Pet*⁻-Mutanten konnten bei *Neurospora crassa* (Bertrand et al., 1982) und bei Hefe isoliert werden. In *S. cerevisiae* wurde für zwei mt Mosaik-gene (COB und OX13) gezeigt, daß das RNA-Spleißen oder andere RNA-"Processing"-Schritte unter der Kontrolle von Kerngenen stehen.

Die *pet*⁻-Mutante MSS51 (Faye und Simon, 1983; Simon und Faye, 1984) reichert Transkriptvorstufen der OX13-mRNA an; der Spleiß-defekt der Mutante ist komplex. Die Mutation des Kerngens MIP1 (Kreike et al., Embo J., im Druck) verhindert die Exzision des dritten Introns aus der COB-Prä-mRNA.

Bei einer weiteren *pet*⁻-Mutante, *cbp2* (McGraw und Tzagoloff, 1983) ist die Exzision von b15 blockiert. Wie bei b11 erfolgt die Exzision von b15 in *rho*⁻-Stämmen und ist somit unabhängig von der Existenz eines mt Translationsproduktes (Halbreich et al., 1980; Bonitz et al., 1982; Schmelzer et al., 1982). Ausgehend von *cbp2*-Mutanten konnten Revertanten isoliert werden, bei denen b15 deletiert ist (Hill et al., 1985). Die Existenz solcher Revertanten zeigt, daß weder das CBP2-Genprodukt noch b15 unter solchen Bedingungen (im intronlosen Stamm) für die Expression von Apocy-

tochrom b benötigt werden. Dies bestätigt die spezifische Rolle des CBP2-Produktes beim Spleißen.

Die WT-Gene von CBP2, MSS51 und MIP1 wurden durch die Komplementation der entsprechenden pet^- -Mutanten mit einer WT-Genbank kloniert. Die identifizierten Gene kodieren für basische, polare Proteine mit einer Größe von 27-51 kD (vgl. Tab.8). Viele pet^- -Mutanten betreffen Strukturen von Komponenten der Atmungskette oder weisen einen Einfluß auf Translations-, Transkriptions- und Regulationsprozesse auf. Es sind daher aufwendige Untersuchungen notwendig, um aus dem Kollektiv solche mit einem direkten Effekt auf das mt Spleißen zu erkennen und zu bestimmen, wo das RNA-"Processing" gestört ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der umgekehrte Weg beschritten. Ausgehend von einer mt Mutation, M1301, die nachgewiesenermaßen das Intronspleißen betrifft, wurden Revertanten isoliert, die über ein mutiertes Kerngen diesen Spleißdefekt kompensieren.

4.3 Das Kern-kodierte N3-Genprodukt

Nur ein geringer Prozentsatz der isolierten Suppressormutationen zu M1301 war Kern-kodiert. Mit R101 wurde eine dominante M1301-allelspezifische Revertante mit einem hitzesensitiven Phänotyp isoliert. Die strikt allelspezifische Komplementation durch R101 deutet auf eine spezifische Interaktion dieses Genproduktes hin. Ein Nachteil der Klonierung von Suppressorallelen beruht darauf, daß nicht auf etablierte Genbanken zurückgegriffen werden kann. Diese sind von WT-Stämmen abgeleitet und enthalten das entsprechende sup^+ -Allel, das vermutlich nicht komplementiert. Durch die

Transformation mit hybriden Vektoren der Genbank des SUP⁻-Stammes wurden hier drei Klone isoliert, die den durch die Mutation M1301 verursachten Spleißdefekt bei 23°C und 30°C supprimierten. Nach Restriktionsanalysen hatten alle drei Klone (N1, N2, N3) das gleiche genomische Fragment inseriert. Die temperaturabhängige Suppression (hs) von M1301 durch N1, N2, N3 und SUP101 mag bedeuten, daß N3 (bzw. N1, N2) und SUP101 identisch sind; ein ausreichender Beweis sollte durch die genetische Kartierung von SUP101 erbracht werden. Die DNA-Sequenzanalyse des N3-Inserts identifizierte einen ORF von 1014 b, der potentiell ein Protein von 35 kd spezifiziert. Die charakteristischen Transkriptions-, Translations- und Terminationssignale sind vorhanden. Das Gen wird nachgewiesenermaßen transkribiert; die Transkriptlänge von ca. 1100 b entspricht dem nach den Sequenzdaten erwarteten Wert. Die Expression des ORF gibt einen deutlichen Hinweis darauf, daß das Genprodukt, das N3-Protein, die Ursache für die beobachtete Komplementation des Spleißdefektes ist. Dies stimmt mit der allgemein akzeptierten Vorstellung überein, daß über die mit Membranen hinweg kein Austausch von Polyribonukleotiden stattfindet.

Die Gegenüberstellung von CBP2, MIP1, MSS51 und N3 (vgl. Tab.8) weist Gemeinsamkeiten hinsichtlich des basischen und polaren Charakters der hypothetischen Proteine auf. Die Polarität des N3-Proteins liegt mit 43% im Rahmen der Werte, die bei löslichen Proteinen gefunden werden (MSS51: 48%). N3 ist aufgrund eines Restriktionsvergleiches der klonierten Gene verschieden von CBP2, MIP1 und MSS51. Auch ein Computervergleich der Nukleotidsequenzen der kodierenden Bereiche von N3 und CBP2 oder MIP1 zeigt keine Homologien. Längere, nicht polare Bereiche sind im hypothetischen

N3-Protein nicht vorhanden; im 5'-kodierenden Bereich findet sich eine statistische Verteilung der Ladung. Die Verwendung seltener Kodons weist auf eine nur geringe Expressionsrate dieser Proteine hin.

Auch die "RNA-Maturasen" sind basische, globuläre Proteine. Es ist denkbar, daß der basische Charakter auf eine ähnliche Funktion der "RNA-Maturasen" und der identifizierten Kerngene hinweist; möglicherweise spricht diese Eigenschaft der Proteine für eine Interaktion mit Nukleinsäuren. Eine solche Aktivität konnte jedoch bislang für keines der vier Kernproteine nachgewiesen werden. Für einen Vertreter der "RNA-Maturasen", die bI4-Maturase, wurde jedoch gezeigt, daß das in *E. coli* exprimierte Protein eine Affinität für RNA und ss-DNA besitzt, wobei diese interessanterweise für ss-DNA ähnlich stark wie für RNA ist (Delahodde et al., 1985).

Eine Bestätigung, daß das N3-Protein am RNA-Spleißen beteiligt ist, wurde von einem "Gene-Disruption"-Experiment erwartet. Das Ziel ist die Zerstörung des N3-kodierenden Gens in einem Stamm mit WT-Mitochondrien. Die Mitwirkung des N3-Proteins am RNA-Spleißen wäre offensichtlich, wenn der so manipulierte Stamm (N3-Null) spleißdefekt würde. Durch die Deletion eines 490 bp großen *Cla*I-Fragmentes aus dem komplementierenden 1,9 kbp großen Fragments wurden innerhalb des ORF von N3 120 Tripletts deletiert und durch einen selektierbaren Marker (LEU) ersetzt (vgl. Abb.21). Dieses Fragment wurde für eine integrative Deletion (nach der Methode von Rothstein et al., 1983) des N3-Genortes verwendet. Die Deletion des N3-Allels hatte jedoch keinen Effekt auf die Atmungskompetenz (T. Söllner, Diplomarbeit, in Vorbereitung).

Es sind deshalb folgende Punkte zu erörtern:

1. Der essentielle Bereich des Proteins wurde durch die Deletion nicht betroffen;
2. Es besteht die Möglichkeit, daß dieses Gen nicht essentiell ist, da mehrere Kopien desselben Allels oder alternativ anderer Gene mit identischer oder ähnlicher Funktion existieren.

Die erste Hypothese, derzufolge der funktionelle Bereich des Proteins nicht deletiert wurde, konnte durch die Transformation des spleißdefekten Empfängerstammes mit einem "Multi-copy"-Plasmid, welches das N3-Null-Allel trägt, widerlegt werden. Die vorher erreichte Suppression durch das "Multi-copy"-Plasmid mit dem intakten N3-Allel war durch die Einführung der Deletion verloren gegangen. Daneben ist die zweite Hypothese zu berücksichtigen, derzufolge das N3-Protein nicht essentiell ist, so daß die Zerstörung des Allels im WT durch andere Genprodukte kompensiert werden kann, während sich die Suppression von M1301 nur durch das mutierte N3-Allel erreichen läßt.

Bei *S. cerevisiae* ist eine Reihe von Genen bekannt, deren Zerstörung keineswegs eine Letalität für die Zelle nach sich zieht. Dazu gehören z.B. die RAD-Gene, Gene, welche Proteine spezifizieren, die an Reparaturprozessen, bedingt durch UV, MMS oder Röntgenstrahlen beteiligt sind. Die Deletion von RAD-50 zeigt keinen Effekt; RAD-50-Null-Zellen sind phänotypisch von Zellen, welche das entsprechende WT-Allel besitzen, nicht zu unterscheiden, während die RAD-6-Null-Deletion einen gewissen Wachstumsnachteil bedingt (Kupiec und Simchen, 1984).

Auch für einen Vertreter von zahlreichen bekannten SSB-Genen ("single stranded nucleic acid binding protein"), SSB1, sind

Ergebnisse von "Gene-Disruption"-Experimenten bekannt (Ambrose und Campbell, 1986). SSB1 spezifiziert ein Protein, das einzelsträngige Nukleinsäuren bindet und vermutlich beim RNA-"Processing" und der DNA-Replikation beteiligt ist. SSB1-Null-Allele zeigen keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten. Durch Untersuchungen wurde bestätigt, daß wahrscheinlich ein zweites Gen, welches für ein ähnliches Protein kodiert, diese Funktion übernimmt. Auch für verschiedene andere Gene, wie die RAS-Gene (Tatchell et al., 1984), die Histone H2A (Rykowski et al., 1981), H2B (Kolodrubetz et al., 1982) und das ribosomale Protein p51 (Abovich et al., 1984) existieren zwei nicht identische Gene. Die Inaktivierung eines Gens verursacht keinen Phänotyp, während die Deletion beider Gene mehr oder weniger einschneidende Konsequenzen für verschiedene Zellfunktionen hat. So führt beispielsweise die Deletion beider RAS-Gene zu einem Defekt der Sporulation (Tatchell et al., 1984).

Zusammenfassend läßt sich durch die aufgeführten Beispiele die Existenz von Genfamilien in Hefe nachweisen, so daß das erhaltene Ergebnis aus dem "Gene-Disruption"-Experiment von N3 in dieser Hinsicht zu erklären sein könnte.

Zur Bestimmung, ob identische Kopien des Gens dupliziert vorliegen, wurde ein genomisches Southern-Experiment unter mäßig stringenten Bedingungen durchgeführt. Durch diesen Southern-"Blot" konnten jedoch keine weiteren Fragmente identifiziert werden. Die Existenz eines nicht kreuz-hybridisierenden Gens mit ähnlicher Funktion ist jedoch nicht auszuschließen.

4.4 Proteine und Intron-"Selfsplicing"

Durch den Nachweis der Intron-Autoexzision in zellfreien Extrakten wurde gezeigt, daß ein direkter Einfluß von Proteinen am Spleißprozeß, vorstellbar durch eine endonukleolytische Aktivität, nicht existiert. Mehrere Gründe sprechen aber dafür, daß bei der in vivo-Exzision von Introns, die in vitro autokatalytische Aktivität zeigen, Proteine notwendig sind:

1. Bei *S. cerevisiae* ist eine Beteiligung von Proteinen durch die Existenz der Kernmutation SUP101 wahrscheinlich. Diese Mutation komplementiert den spleißdefekten Stamm M1301, der in vivo und in vitro die Exzision von bII verhindert.
2. Bei *Neurospora crassa* wurde eine Kernmutante identifiziert, welche in vivo das Spleißen verhindert, obwohl das entsprechende Intron in vitro autokatalytisch exzidiert wird (Garriga et al., 1984).
3. Die Autoexzision in vitro ist ein ineffizienter Prozeß. Die Spleißreaktion ist verzögert, und nur ein Teil der eingesetzten Prä-mRNA wird prozessiert, während die Exzision dieser Introns in vivo rasch und effizient erfolgt (Schmelzer et al., 1981).
4. Die Klasse II-Introns a11 und a12 im mt Gen von OX13, die ähnliche Sekundärstrukturen wie das autokatalytisch spleißende bII haben, enthalten lange offene Leserahmen. Genetische Untersuchungen zeigen, daß die Expression der offenen Leserahmen, zumindest für a11, die Voraussetzung für die Exzision des entsprechenden Introns ist (Carignani et al., 1983). Auch für Klasse I-Introns sind solche Beispiele beschrieben.

4.5 Mögliche Funktion des N3-Proteins

Da die AS-Sequenz von N3 und den anderen identifizierten pet-Genen keine Homologie mit Proteinen bekannter Funktion aufweist, und über die Bedeutung der "RNA-Maturasasen" wenig bekannt ist, läßt sich über den Aktionsmechanismus der am Spleißen beteiligten Proteine noch kaum etwas aussagen. Hypothetisch sind viele Möglichkeiten in Betracht zu ziehen, wie diese Kernproteine (bzw. N3) am mt Spleißen mitwirken könnten.

Bei Introns mit autokatalytischer Aktivität ist die Funktion der Proteine akzessorisch. Denkbar ist eine Beteiligung bei der Erkennung spezifischer Sequenzen; dies kann zum einen die Identifizierung von Spleißgrenzen betreffen, zum anderen verschiedene interne Sequenzen, welche zur Bildung einer spleißgerechten Sekundär- bzw. Tertiärstruktur beitragen. Durch das Fehlen von "Second-site"-Suppressoren bei Klasse II-Introns ist, entgegen der Situation bei Klasse I-Introns, die biologische Aktivität der theoretisch ermittelten Sekundärstruktur nicht eindeutig nachgewiesen.

Die intramolekulare Basenpaarung ist eine Möglichkeit zur Bildung einer drei-dimensionalen RNA-Struktur; diese kann aber auch durch sequenzspezifische, RNA-bindende Proteine aufrechterhalten werden. Die Funktion der Proteine könnte darin bestehen, entweder zwei weit voneinander entfernte Sequenzen zu verbinden (analog der Heteroduplexbildung durch Basenpaarung) oder als akzessorische Faktoren an vorgebildete Strukturen zu binden und diese zu stabilisieren. Während bei Klasse I-Introns die Sekundärstruktur primär durch die Basenpaarung interner RNA-Sequenzen zustande

kommt, könnten bei einigen Klasse II-Introns Proteine maßgeblich an der Aufrechterhaltung dieser Struktur beteiligt sein.

Die Erkennung der Spleißgrenzen beruht bei einigen Introns vermutlich nicht nur auf den kaum konservierten Exon/Intron-Sequenzen. Die bekannten Modelle über den Mechanismus des autokatalytischen Spleißens geben noch keine ausreichenden Hinweise darauf, wie gewährleistet ist, daß die 5'-Spleißgrenze mit der nächsten, distalen 3'-Spleißstelle verknüpft wird. Von Solnick (1986) wurde gezeigt, daß in vitro durch die Einführung von "Hairpins" an den Exon/Introngrenzen diese Spleißspezifität verändert werden kann, so daß Exons mit den umgebenden Introns exzidiert werden. Es sind also bestimmte Strukturen in der Nähe der Spleißgrenzen vorhanden; bei Kern-mRNA-Prekursoren gibt es Hinweise, daß diese als Erkennungssignale für Proteine des snRNP-Komplexes dienen. Möglicherweise interagieren auch bei den Introns der Organellen Proteine mit solchen Sequenzabschnitten.

Die Spleißreaktion in vitro (Klasse II) erfordert Spermidin, ein Polyamin, als notwendigen Cofaktor. Polyamine, die mehrfach positiv geladen sind und mit der DNA einiger Bakterien und Viren assoziiert sind, sollen bei der Reaktion in vitro für die Neutralisation der negativen Ladung verantwortlich sein. Teilweise scheint die Rolle der Polyamine über eine unspezifische Funktion hinauszugehen. Durch Arbeiten von Quigley et al. (1978) wurde gezeigt, daß die Tertiärstruktur von tRNA-Spezies durch die Bindung von Spermidin lokal verändert werden kann. Dies mag bedeuten, daß Polyaminen allgemein durch die Neutralisation von Kationen und die Konzentration der negativen Ladung, eine wichtige Aufgabe bei der Bildung von RNA- und DNA-Strukturen zukommt.

In vivo könnten Proteine solche Funktionen übernehmen; der basische Charakter der identifizierten Proteine spricht für diese Annahme.

Daneben ist eine Vielzahl indirekter Funktionen denkbar, wie die Aktivierung von Proteinen der beschriebenen Aktivitäten oder die Katalyse von Transportprozessen in die Mitochondrien.

Die Interaktion von SUP101 mit bII ist durch zwei Fakten charakterisiert:

1. bII kann in vitro autokatalytisch exzidiert werden;
2. Das SUP101-Genprodukt ist allelspezifisch.

Die erste Eigenschaft zeigt, daß dem SUP101-Genprodukt keine selbständige, katalytische Spleißaktivität zukommt. Es sind Funktionen zu favorisieren, mit Hilfe derer die autokatalytische Aktivität gesteigert wird. Da die Mutation von M1301 die Exzision von bII in vitro fast vollständig verhindert, ist dieser Bereich für die Protein-unabhängige, autokatalytische Intronexzision wichtig. Die funktionelle Bedeutung der Struktur wurde in vitro durch die Einführung einer Deletion bestätigt, welche die Bildung des internen "Loops" verhindert, der durch M1301 betroffen ist. Diese Deletion blockiert die bII-Exzision vollständig. Die Untersuchung von Revertanten (Kap. 2.3.1) bestätigte die Bedeutung der Primärsequenz durch den Nachweis der Konservierung dieser Sequenzen.

Der bifunktionelle Charakter der Region wird dadurch illustriert, daß - im Gegensatz zur Situation in vivo - die Mutation M1301 das RNA-Spleißen in vitro vollständig blockiert, ferner, daß der Effekt der Mutation durch die Interaktion mit dem Kernfaktor SUP101 supprimiert werden kann. Basierend auf der Allelspezifität

der Suppression ist anzunehmen, daß SUP101 eine spezifische Erkennungsstruktur für den Bereich um M1301 besitzt. Für diese Interaktion dürfte weniger die Primär- als die Sekundär- und Tertiärstruktur erforderlich sein. Die Mutation M1301 könnte demzufolge eine tertiäre Interaktion im RNA-Molekül betreffen; diese Störung würde durch eine kompensatorische Mutation im SUP101-Gen teilweise wiederaufgehoben. Der temperatursensitive Komplementationsmechanismus weist auf eine nur partiell wiederhergestellte Funktionalität hin. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, daß das identifizierte Protein in die Mitochondrien transportiert wird; aufgrund der beobachteten Hydrophilizität scheint N3 kein Membranbestandteil zu sein, z.B. ein Rezeptormolekül. Proteinbindungsstudien werden darüber Auskunft geben, ob eine direkte Interaktion der durch M1301 identifizierten Sequenz mit dem N3-Protein verwirklicht ist.

4.6 Evolution

Introns sind sehr häufig in Genen der höheren Eukaryonten, seltener in Genen niederer Eukaryonten, und nur in wenigen Fällen in Genen der Prokaryonten nachgewiesen. Dennoch werden Introns nicht als spät in der Evolution erworben angesehen (Lewin, 1986). Es wird angenommen, daß sie eine Voraussetzung für die Entstehung der Gene und die Entwicklung eines komplexen Genoms waren. Die unterschiedliche Häufigkeit von Introns bei Prokaryonten, niederen und höheren Eukaryonten ist vermutlich das Ergebnis einer Selektion für kleine Genome bei Mikroorganismen.

Die Introns, welche die Fähigkeit zur autokatalytischen Exzision besitzen, werden als ursprünglicher Typus angesehen (Sharp, 1985;

Cech, 1986). Introns in den Organellen (Klasse I und II) haben teilweise diesen Status konserviert. Die Mehrzahl rezenter Introns verfügt jedoch nicht mehr über die Fähigkeit der Autokatalyse. Die Introns im Kern haben die für das "Selfsplicing" in *cis* wirksamen Sequenzen verloren; ihre Exzision ist daher von der Anwesenheit von *trans*-aktiven Komponenten (mRNA und Protein) abhängig geworden; vermutlich haben die beteiligten Proteine enzymatische Funktionen.

Einige der konservierten Sequenzelemente der autokatalytisch spleißenden Introns der Klasse II werden in den Sequenzen der Kern-mRNA-Introns gefunden. Sie bestätigen die Hypothesen, daß die Exzision von Introns aus RNA-Sequenzen und die Ligation der Exons ursprünglich autokatalytisch erfolgte. So ähneln sich die konservierten Sequenzen an den Exon/Intron-Grenzen und am "Branchpoint" bei Klasse II- und Kern-mRNA-Introns (Tab.9). Die Lariatstruktur kommt in beiden Fällen durch eine 2'-5'-Phosphodiesterbildung zwischen einem A und einem G zustande (Peebles et al., 1986; Schmelzer und Schweyen, 1986; van der Veen et al., 1986).

Tab.9: Konservierte Sequenzen bei Klasse II- bzw. mRNA-Introns; Y_n: entspricht einer Pyrimidin-reichen Sequenz von 4-11, bei Hefe Kern-mRNA aber nur 2-3 Pyrimidinen; Py:Pyrimidin; Pu:Purin;

Introntypus	5'-Spleiß- grenze	"Branchpoint"	3'-Spleiß- grenze
Klasse II Mitochondrien	$\nabla \text{G}^{\text{A}} \text{G}^{\text{C}} \text{G}$	UACCUAU	AU ∇
Klasse II Chloroplasten/ Euglena	$\nabla \text{GUG}^{\text{C}} \text{G}$		Y _n A ∇ U
mRNA, Kern: Consensus	$\nabla \text{GU}^{\text{A}} \text{G}$	PyXPyTPuAPy	Y _n AG ∇
mRNA, Hefe	∇GUAUG	UACUAAC	Y _n AG ∇

Neben den in Tab.9 aufgeführten, konservierten Sequenzen, scheinen, nachgewiesen an b11 (im in vitro-System), für das RNA-Spleißen von Klasse II-Introns auch Elemente innerhalb des Introns notwendig zu sein (Schmelzer und Schweyen, 1986). Diese Bereiche markieren möglicherweise Interaktionen von RNA-Sequenzen, die eine spezifische tertiäre Faltung erlauben. In den Introns der Kern-mRNA fehlen Consensus-Sekundärstrukturen; Deletionsmutanten beweisen, daß lediglich die Randsequenzen für das RNA-Spleißen essentiell sind.

Die autokatalytische Exzision von Organell-Introns und die RNP-abhängige Exzision von Kern-mRNA-Introns sind Extreme. Es ist anzunehmen, daß die Introns in den mt Prä-mRNA-Spezies eine unterschiedliche Abhängigkeit von akzessorischen Komponenten, die für das RNA-Spleißen benötigt werden, zeigen. Die Existenz von solchen Zwischenformen ist noch nicht eindeutig nachgewiesen. Möglicherweise ist bei einigen Introns, zwischen Kern-mRNA-Introns und autokatalytisch spleißende Introns einzuordnen, die RNA-Sekundärstruktur so ineffektiv, daß daraus eine weitgehende Abhängigkeit von akzessorischen Proteinen resultiert. Solche Proteine dürften keine typischen enzymatischen Funktionen beim RNA-Spleißen haben; sie können mitochondrial- ("RNA-Maturasasen") und Kern-kodiert sein. Es gibt Hinweise, daß an der Exzision von einigen Maturase-kodierenden Introns zusätzlich Kernfaktoren beteiligt sind (Simon und Faye, 1984), so daß, bedingt durch die Interaktion mehrerer Proteine und Faktoren, ein komplexer Mechanismus für die Exzision solcher Introns sorgt.

Das Spleißen der COB-Prä-mRNA stellt sich bislang als ein vielfältiger Prozeß dar. Die Exzision der einzelnen Introns innerhalb dieses Gens scheint nach verschiedenen Mechanismen und mit der Beteiligung unterschiedlicher Faktoren zu erfolgen. Da die Introns innerhalb des gleichen Gens liegen, ist nicht anzunehmen, daß dieses System gewisse Vorteile durch differenzielle Regulationsmöglichkeiten bietet. Wahrscheinlicher ist die Erklärung, daß die Introns verschiedenen Ursprungs sind, und die Organisation zu ihrer Exzision bei der Integration in das mitochondriale Genom bereits besaßen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgelegten Untersuchungen nehmen ihren Ausgang von einer Mutation im ersten Intron des für Apocytochrom b kodierenden Gens (Intron bI1 von COB) in Hefe-Mitochondrien. Diese Mutation, M1301, stellt eine Deletion von -1bp aus einer Serie von 5A dar, in einer Entfernung von 507 bp vom 3'-Ende des Introns; sie blockiert die Exzision des Intron bI1 aus der COB-Prä-mRNA. Die molekulare Ursache für diesen Block war unklar - zumal die Mutation nicht einen der als funktionell wichtig erkannten helikalen Bereiche der Intron-RNA betrifft, sondern eine ungepaarte Sequenz. Drei Klassen von Revertanten mit Sekundärmutationen, die den Spleißdefekt der Mutante M1301 supprimieren, wurden isoliert und molekulargenetisch charakterisiert.

1. Rückmutationen zum Wildtyp oder Pseudo-Wildtyp:

Neben der Reversion zur Wildtyp-Sequenz 5'-GAAAAAG-3' kann nur eine von vielen möglichen +1bp -Insertionen, nämlich zur Pseudo-Wildtyp-Sequenz 5'-GAAAAGG-3' die Funktion der Sequenz im RNA-"Splicing" wiederherstellen. Dies spricht für eine Funktion dieser Sequenz *per se*, z.B. für die Interaktion mit einem Protein aber gegen die Beteiligung an einer Heteroduplexstruktur.

2. Deletion des Introns bI1 aus der mt DNA:

Mit einer Häufigkeit von 10^{-7} treten Revertanten auf, die das gesamte Intron bI1 aus der mt DNA deletiert haben und so das mutierte Allel entfernt haben, das die Expression von Apocytochrom b verhinderte. Die Deletion ligiert basengenau das erste und das zweite Exon des COB-Gens. Die Genauigkeit und relativ große Häufigkeit der Introndeletionen werden als Hinweis auf einen spezifischen Mechanismus der Introndeletion aus der mt DNA diskutiert.

3. Revertanten mit einer Suppressormutation im Zellkern:

Mit geringer Häufigkeit konnten Revertanten isoliert werden, welche die primäre Mutation M1301 behalten haben, aber durch eine sekundäre Mutation im Zellkern diesen Block der Exzision von bI1 aus der mt COB-Prä-mRNA supprimieren. Eine Revertante aus diesem

Kollektiv zeigte eine M1301-allelspezifische Art der Suppression; der Effekt anderer Mutationen in b11 und in weiteren Introns von COB und OXI3 (Cytochromoxidase-Gen/Untereinheit I) Introns konnte durch dieses Suppressorallel nicht behoben werden. Genetische Untersuchungen ergaben, daß das SUP101-Allel dominant ist und bei 23°C und 30°C supprimiert, nicht jedoch bei höheren Temperaturen (36°C).

Mittels molekularer Klonierung wurde versucht, das die SUP101-Mutation tragende Kerngen zu isolieren und zu sequenzieren. Als Ergebnis dieser Studien wurde ein DNA-Fragment (N3) von 2 kbp Länge erhalten. Die Transformation der Mutante M1301 mit diesem Fragment führte zur Suppression des mt RNA-Spleißdefektes mit ähnlichen Charakteristika wie sie an der SUP101-Revertante zu beobachten waren. Durch die Hybridisierung mit der entsprechenden chromosomalen Bande wurde das N3-Fragment auf Chromosom 10 lokalisiert. Die Sequenzierung des N3-DNA-Fragmentes zeigte, daß es für ein Protein von 314 AS (35 kd) kodieren kann, das ähnliche Eigenschaften besitzt wie andere Kerngene, die am RNA-Spleißen beteiligt sein sollen. In Northern-Analysen wurde ein Transkript des N3-Gens mit einer Größe von 1100 b identifiziert.

Das N3-Gen ist zwar für die Suppression der M1301-Mitochondrien notwendig, aber es ist nicht essentiell für die Funktion der Wildtyp-Mitochondrien, wie durch die Konstruktion eines N3-Null-Allels gezeigt wurde. Die mögliche Funktion des N3-Genproduktes wird diskutiert unter besonderer Berücksichtigung der Tatsache, daß die Exzision von b11 in vitro autokatalytisch erfolgen kann.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

- Abelson, J. (1979): RNA-processing and the intervening sequence problem. *Ann.Rev.Biochem.* 48,1035-1069
- Ambrose, Y.-S. and Campbell, J.L. (1986): Isolation of the gene encoding yeast single-stranded nucleic acid binding protein 1. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 83,877-881
- Anderson, C.W. and Buzash-Pollert, E. (1980): Can ACG serve as an initiation codon for protein synthesis in eucaryotic cells? *Mol. Cell.Biol.* 5,3621-3624
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature (London)* 290,457-465
- Ansorge, W. and de Maeyer, L. (1980): Thermally stabilized very thin (0.02-0.3mm) polyacrylamide gels for electrophoresis. *J.Chromatogr.* 202,45-53
- Anziano, P.Q., Hanson, D.K, Mahler, H.R. and Perlman, P.S. (1982): Functional domains in introns: Trans-acting and cis-acting regions of intron 4 of the COB-gene. *Cell* 30,925-932
- Arnberg, A.C., van Ommen, G.J.B., Grivell, L.A., van Bruggen, E.F.J. and Borst, O. (1980): Some yeast mitochondrial RNAs are circular. *Cell* 12,313-319
- Arnberg, A.C., van der Horst, G. and Tabak, H.F. (1986): Formation of lariats and circles in self-splicing of the precursor to the large ribosomal RNA of yeast mitochondria. *Cell* 44,235-242
- Attardi, G., Cantatore, A., Chomyn, Chreus, S., Gelfand, R., Merkel, C., Montoya, J. and Ojala, D. (1982): A comprehensive view of mitochondrial gene expression in human cells. In: *Mitochondrial Genes*, pp. 51-71, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (eds.: Slonimski, P.P., Borst, P. and Attardi, G.)
- Attardi, G., Doersen, C., Gaines, G., King, M. and Montoya, J. (1985): New insights into the mechanism of RNA-synthesis and processing in human mitochondria. In: *Achievements and perspectives of mitochondrial research*, Vol.II/Biogenesis, pp. 145-164, Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello, E., Slater, E.C., Palmieri, F., Saccone, C. and Kroon, A.M.)
- Bechmann, H., Haid, A., Schweyen, R.J., Mathews, S. and Kaudewitz, F. (1981): Expression of the split gene COB in yeast mtDNA. Translation of intervening sequences in mutant strains. *J.Biol.Chem.* 256,3525-3531
- Beggs, B. (1978): Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature (London)* 175,104-109

Belcour, L. and Vierny, C. (1986): Variable DNA splicing sites of a mitochondrial intron: relationship to the senescence process in *Podospora*. *Embo J.* **5**, 609-614

Bennetzen, J. and Hall, B. (1982): Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **257**, 3018-3025

Bertrand, H., Bridge, P., Collins, R.A., Garriga, G. and Labowitz, A.M. (1982): RNA splicing in *Neurospora mitochondria*: Characterization of new nuclear mutants with defects in splicing the mitochondrial large rRNA. *Cell* **22**, 517-526

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Black, D.L., Chabot, B. and Steitz, J.A. (1985): U1 as well as U2 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA-splicing. *Cell* **42**, 737-750

Bogorad, L. (1975): Evolution of organelles and eucaryotic genomes. *Science* **188**, 891-898

Bonitz, S.G., Homison, G., Thalenfeld, B.E. and Tzagoloff, A. (1982): Assembly of the mitochondrial membrane system. Processing of the apocytochrome b precursor RNA in *S. cerevisiae* D273-10B. *J. Biol. Chem.* **257**, 6268-6274

Borst, P. and Grivell, L. (1981): Small is beautiful- portrait of a mitochondrial genome. *Nature (London)* **290**, 443

Broach, J.R., Strathern, J.N. and Hicks, J. (1979): Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. *Gene* **8**, 121-133

Brody, E. and Abelson, J. (1985): The "splicosome": Yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**, 963-967

Burger, G. and Werner, S. (1983): Nucleotide-sequence and transcript mapping of a mt-DNA segment comprising COXI, tRNA^{arg} and several unidentified reading frames in *Neurospora crassa*. In: *Mitochondria 1983*, pp. 331-342, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.)

Capaldi, R.A. and Vanderkooi, G. (1972): The low polarity of many membrane proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **62**, 930-932

Carignani, G., Groudinsky, O., Frezza, D., Schiavon, E., Bergantino, E. and Slonimski, P.P. (1983): An mRNA maturase is encoded by the first intron of the mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome oxidase in *S. cerevisiae*. *Cell* **35**, 733-742

Carle, G.F. and Olson, M.V. (1985): An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3756-3760

Cech,T.R., Tanner,N.K., Tinoco,T., Weir,B.R., Zuker,M. and Perlman,P.S. (1983): Secondary structure of the Tetrahymena ribosomal RNA intervening sequence: Structural homology with fungal mitochondrial intervening sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 3903-3907

Cech,T.R. (1986): The generality of self-splicing RNA: Relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* 44,207-210

Chen,N. and Struhl,K. (1985): Yeast mRNA-initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from the TATA-element. *Embo J.* 4,3273-3280

Clewell,D.B. (1972): Nature of Col E₁ plasmid replication in *E. coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.*, 110,667-676

Conde,J. and Fink,G.R. (1976): The low polarity of many membrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 62,930-932

Delahodde,A., Banroques,J., Becam,A.M., Goguel,V., Perea,J., Schroeder,R. and Jacq,C. (1985): Purification of yeast bI4 mRNA maturase from *E. coli* and from yeast. Nucleic acids binding properties. In: Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol.II/Biogenesis, pp. 79-88, Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello,E., Slater,E.C., Palmieri,F., Saccone,C. and Kroon,A.M.)

De la Salle,H., Jacq,C. and Slonimski,P.P. (1982): Critical sequences within mitochondrial introns: Pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box intron controlling reductase and oxidase. *Cell* 28,721-732

Deutsch,J., Dujon,B., Netter,P., Petrochilo,E., Slonimski,P.P., Bolotin-Fukuhara,M., Coen,D. (1974): Mitochondrial Genetic VI: The petite mutation in *S. cerevisiae*: interrelations between the loss of the rho⁺ factor and the loss of the drug resistance mitochondrial genetic markers. *Genetics* 76,195-219

Dieckmann,C.L., Pape,L.K. and Tzagoloff,A. (1982): Identification and cloning of a yeast nuclear gene (CBP1) involved in expression of mitochondrial cytochrome b. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79,1801-1809

Dobson,M.J., Tuite,M.F., Roberts,N.A., Kingsman,A.J., Kingsman,S.M., Perkins,R.E., Conroy,S.C., Dunbar,B. and Fothergill,L.A. (1982): Conservation of high efficiency promoter sequences in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 10,2625-2637

Douglas,M. and Takeda,M. (1985): Nuclear genes incoding mitochondrial proteins in yeast. *Trends in Biochem. Sci.* 10,192-194

Dujardin,G., Pajot,P., Groudinsky,O. and Slonimski,P.P. (1980): Long range control circuits within mitochondria and between nucleus and mitochondria. I. Methodology and phenomenology of suppressors. *Mol.Gen.Genet.* 172,469-482

Dujon, B., Slonimski, P.P. and Neill, L. (1974): Mitochondrial Genetics. IX. A model of recombination and segregation of mitochondrial genomes in *S. cerevisiae*. *Genetics* **78**, 415-437

Dujon, B. (1980): Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the *w* and *rib-1* loci. *Cell* **20**, 185-197

Dujon, B. (1983): Mitochondrial genes, mutants, maps - a review. In: *Mitochondria 1983*, pp. 1-24, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.)

Dujon, B., Cottarel, G., Colleaux, L., Betermier, M., Jacquier, A., D'Auriel, L. and Galibert, F. (1985): Mechanism of integration of an intron within an mitochondrial gene: A double strand break and the transposase function of an intron encoded protein as revealed by *in vivo* and *in vitro* assays. In *achievements and perspectives of mitochondrial research*. Vol. II/Biogenesis, pp. 215-226; Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello, E., Slater, E.C., Palmieri, F., Saccone, C. and Kroon, A.M.)

Faye, G., Denebouy, N., Kujawa, C. and Jacq, C. (1979): Inserted sequence in the mitochondrial 23S-ribosomal RNA gene of the yeast *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **168**, 101-109

Faye, G. and Simon, M. (1983): Analysis of a yeast nuclear gene involved in the maturation of mitochondrial pre-messenger RNA of the cytochrome oxidase subunit I. *Cell* **32**, 77-87

Gargouri, A., Lazowska, J. and Slonimski, P.P. (1983): DNA splicing of introns: a general way of reverting intron mutations. In: *Mitochondria 1983*, pp. 259-268 Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.)

Garriga, G. and Lambowitz, A.M. (1984): RNA splicing in *Neurospora* mitochondria: Self-splicing of a mitochondrial intron *in vitro*. *Cell* **38**, 631-642

Gilbert, W. (1985): Genes-in-pieces revisited. *Science* **228**, 823-824

Grabowski, P.J., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. (1984): Messenger RNA splicing *in vitro*: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* **37**, 415-427

Greer, C.L., Peebles, C.L., Gegenheimer, P. and Abelson, J. (1983): Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing. *Cell* **32**, 537-546

Greer, C.L. and Abelson, J. (1984): RNA splicing: rearrangement of RNA sequences in the expression of split genes. *Trends in Biochem. Sci.* **9**, 139-141

Grivell, L.A. (1983): Mitochondrial gene expression 1983. In: *Mitochondria 1983*, pp. 25-46, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.)

Grosch,G. (1980): Zur Struktur und Funktion des mitochondrialen Genomes von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität München

Groudinski,O., Dujardin,G. and Slonimski,P.P. (1981): Long range control circuits within mitochondria and between nucleus and mitochondria. *Mol.Gen.Genet.* 184,493-503

Guarente,L. and Mason,T. (1983): Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream regulation site. *Cell* 32,1279-1286

Guthrie,C. and Abelson,J. (1983): Organization and expression of tRNA genes in *S. cerevisiae*. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression.* pp. 123-133, Cold Spring Harbor, New York (eds.: Strathern,J.N., Jones,E.W. and Broach,J.R.)

Halbreich,A., Pajot,P., Foucher,M., Grandchamp,C. and Slonimski,P.P. (1980): A pathway of cytochrome b mRNA processing in yeast mitochondria: specific splicing steps and an intron derived circular RNA. *Cell* 12,321-329

Hay,R., Böhni,P. and Gasser,S. (1984): How mitochondria import proteins? *Biochim.Biophys.Acta* 772,65-87

Hensgens,L.A.M., Bonen,L., de Haan,M., van der Horst,G. and Gri-
vell,L.A. (1983): Two intron sequences in yeast mitochondrial *COX1* gene: Homology among URF-containing introns and strain dependent variation in flanking exons. *Cell* 32,379-389

Hill,J., McGraw,P. and Tzagoloff,A. (1985): A mutation in yeast mitochondrial DNA results in a precise excision of the terminal intron of the cytochrome b gene. *J.Biol.Chem.* 260,3235-3238

Hinnen,A., Hicks,J.B. and Fink,G.R. (1978): Transformation of yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75,1929-1933

Hinnen,A. and Fink,G.R. (1979): Properties of yeast transformation. Cold Spring Harbor, *Symp.Quant.Biol.* 43,1305-1313

Hinnen,A. and Meyhak,B. (1982): Vectors for cloning in yeast. *Current Topics in Microbiology and Immunobiology* 26,101-117

Holl,J., Rödel,G. and Schweyen,R.J. (1985): Suppressor mutations identify box9 as a central nucleotide sequence in the highly ordered structure of intron RNA in yeast mitochondria. *Embo J.* 4,2081-2085

Hollenberg,C.P. (1982): Cloning with 2 μ DNA-vectors and the expression of foreign genes in *S. cerevisiae*. In: *Current topics in microbiology and immunology* 26,119-144

Hurt,E.C., Pesold-Hurt,B. and Schatz,G. (1984): The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to

- direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* 178,306-310
- Jacq,C., Pajot,P., Lazowska,J., Dujardin,G., Claisse,M., Groudinski,O., de la Salle,H., Grandchamp,C., Labouesse,M., Gargouri,A., Guiard,B., Spyridakis,A., Dreyfus,M. and Slonimski,P.P. (1982): Role of introns in the yeast cytochrome b gene: cis- and trans-acting signals, intron manipulation, expression and intergenic communications. In: *Mitochondrial genes*, pp. 155-183, Cold Spring Harbor Laboratory (eds.: Slonimski,P.P., Borst,P. and Attardi,G.)
- Jacq,C. Banroques,J., Becam,A.M., Slonimski,P.P. and Dunchin,A. (1984): Antibodies against a fused "lacZ-yeast mitochondrial intron" gene product allow identification of the mRNA maturase encoded by the fourth intron of the yeast COB-BOX gene. *Embo J.* 3,1567-1572
- Karlin-Neumann,G.A. and Tobin,E.M. (1986): Transit peptides of nuclear encoded chloroplast proteins share a common amino-acid framework. *Embo J.* 5,9-13
- Keller,W. (1984): The RNA-lariat: A new ring to the splicing of mRNA precursors. *Cell* 32,423-425
- Keller,W. and Noon,W.A. (1984): Intron splicing: a conserved internal signal in introns of animal pre-mRNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81,7417-7420
- Keller,M. and Michel,F. (1985): The introns of the *Euglena gracilis* chloroplast gene which codes for the 32 kD protein of photosystem II. *FEBS Lett.* 172,69-78
- Kolodrubetz,D., Rykowski,M.C. and Grunstein,M. (1982): Histone H2A subtypes associate interchangeably in vivo with histone H2B subtypes. *Proc.Acad.Sci.USA* 72,7814-7818
- Kotylak,Z. and Slonimski,P.P. (1979): Joint control of cytochrome a and b by a unique mitochondrial DNA region comprising four genetic loci. In: *The genetic function of mitochondrial DNA*, pp. 143-154 Elsevier, Amsterdam (eds.: Saccone,C. and Kroon,A.M.)
- Kotylak,Z., Lazowska,J. and Slonimski,P.P. (1985): Intron encoded proteins of mitochondria: Key elements of gene expression and genomic evolution. In: *Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol.II/Biogenesis*, pp. 1-20, Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello,E., Slater,E.C., Palmieri,F. and Kroon,A.M.)
- Kovacova,V., Irmilerova,J. and Kovac,L.V. (1968): Oxidative phosphorylation in yeast: Combination of a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency. *Biochim.Biophys.Acta* 162,157
- Kozak,M. (1981): Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiation codon by eucaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 2,5233-5250

- Kozak, M. (1982): Analysis of ribosome binding site from the S1-message of Reovirus. *J.Mol.Biol.* **156**,807-820
- Kozak, M. (1986): Point mutations define a sequence flanking the AUG initiation codon that modulates translation by eucaryotic ribosomes. *Cell* **44**,283-292
- Krämer, A., Keller, W., Appel, B. and Lührmann, R. (1984): The 5'-terminus of the moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **38**,299-307
- Krainer, A.R. and Maniatis, T. (1984): Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **42**,725-736
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982): Self-splicing RNA: Autoexzision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**,147-157
- Kupiec, M. and Simchen, G. (1984): Cloning and integrative deletion of the RAD6 gene of *S. cerevisiae*. *Curr. Genetics* **8**,559-566
- Labouesse, M., Dujardin, G. and Slonimski, P.P. (1985): The yeast nuclear gene NAM2 is essential for mitochondrial DNA integrity and can cure a mitochondrial RNA-maturase deficiency. *Cell* **41**,133-143
- Lamoureux, A., Pajot, P., Kochko, A., Halbreich, A., Slonimski, P.P. (1982): Cytochrome b mRNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene. II. Trans- and cis-acting mechanism of mRNA splicing. In: The organization and expression of the mitochondrial genome, pp. 153-156, Elsevier, Amsterdam (eds.: Saccone, C. and Kroon, A.M.)
- Lancashire, W.E. and Mattoon, J.R. (1979): Cytoduction: A tool for mitochondrial genetic studies in yeast. *Mol.Gen.Genet.* **20**,333-344
- Lang, F.B. (1984): The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: highly homologous introns are inserted of the same position of the otherwise less conserved COX1-genes in *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus nidulans*. *Embo J.* **3**,2129-2136
- Lang, B., Burger, G., Doxiades, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W. and Kaudewitz, F. (1977): A simple method for the large scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal.Biochem.* **77**,110-121
- Lang, B.F., Ahne, F. and Bonen, L. (1985): The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The cytochrome b gene has an intron closely related to the first two introns in the *Saccharomyces cerevisiae* COX1 gene. *J.Mol.Biol.* **184**,353-366

Langford,C.J. and Gallwitz,D. (1983): Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. *Cell* 33,519-527

Lazowska,J., Jacq,C. and Slonimski,P.P. (1980): Sequence of introns and flanking exons in wildtype and box3-mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell* 22,333-348

Lazowska,J., Gargouri,A. and Slonimski,P.P. (1983): The corrected sequence of the COB-BOX gene in the yeast strain 777-3A. In: *Mitochondria 1983*, pp. 405-410, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen,R.J., Wolf,K. and Kaudewitz,F.)

Leaver,C.J., Hack,E., Dawson,J.A. Isaac,G.P. and Jones,P.V. (1983): Mitochondrial genes and their expression in higher plants. In: *Nucleo-mitochondrial interactions*, pp. 269-284, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen,R.J., Wolf,K., and Kaudewitz,F.)

Lewin,A., Marimoto,R., Rabiowitz,M., Fukuhara,A. (1978): Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: classification of petites and deletion mapping of mitochondrial genes. *Mol.Gen.Genet.* 163,257-275

Macreadie,I.G., Scott,R.M., Zinn,A.R. and Butow,R.A. (1985): Transposition of an intron in yeast mitochondria requires a protein encoded by that intron. *Cell* 41,395-402

Magasanik,B. (1961): Catabolite repression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 26,249-262

Maniatis,T., Fritsch,E.F. and Sambrook,J. (1982): *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Maxam,A. and Gilbert,W. (1980): Sequencing end labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth.Enzymol.* 65,499-560, Academic Press (eds.: Grossman,L. and Moldave,K.)

McGraw,P. and Tzagoloff,A. (1983): Assembly of the mitochondrial membrane system; characterization of a yeast nuclear gene involved in the processing of the cytochrome b pre-mRNA. *J. of Biol. Chem.* 15,9459-9468, Academic Press (eds.: Grossman,L. and Moldave,K.)

McNeill,J.B. and Smith,M. (1986): Transcription initiation of the *S. cerevisiae* iso-1-cytochrome c gene: Multiple, independent TATA-sequences. *J.Mol.Biol.* 187,363-378

Messing,J. (1983): New M13 vectors for cloning. In: *Methods in Enzymology* 101,20-78. Academic Press, New York (eds.: Wu,R., Grossman,L. and Moldave,K.)

Michel,F., Jacquier,A. and Dujon,B. (1982): Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA second

dary structure. *Biochimie* 64,867-881

Michel,F. and Dujon,B. (1983): Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *Embo J.* 2,33-38

Michel,F and Lang,B. (1985): Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. *Nature (London)* 16,641-642

Naggert,I. and Schweizer,E. (1983): Interference of *S. cerevisiae* nuclear mutations with mitochondrial rRNA biosynthesis and OXI 3-transcript maturation. In: *Mitochondria 1983*, pp. 425-432, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen,R.J., Wolf,K. and Kaudewitz,F.)

Nasmyth,K. and Reed,S. (1980): Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 77,2119-2123

Netter,P., Jacq,C., Carignani,G. and Slonimski,P.P. (1982): critical sequences within mitochondrial introns: cis-dominant mutations of the "cytochrome b-like" intron of the oxidase gene. *Cell* 28, 733-738

Nobrega,F.G. and Tzagoloff,A. (1980): Assembly of the mitochondrial membrane system-DNA sequence and organization of the cytochrom b gene in *S. cerevisiae* D273-10B. *J.Biol.Chem.* 255,9828-9837

Padgett,R.A., Mount,S.M., Steitz,J.A. and Sharp,P.A. (1983): Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonuclear protein. *Cell* 35,101-107

Padgett,R.A., Konarska,M.M., Grabowski,P.J., Hardy,S.F. and Sharp,P.A. (1984): Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225,898-903

Peebles,C.L., Gegenheimer,P., Abelson,J. (1983): Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane associated yeast endonuclease. *Cell* 32,525-536

Perea,J. and Jacq,C. (1985): Role of the 5'-hairpin structure in the splicing accuracy of the fourth intron of the yeast COB-BOX gene. *Embo J.* 4,3281-3288

Pillar,T., Kreike,J., Lang,F. and Kaudewitz,F. (1983): Nuclear mutants defective in processing of cob and oxi3 transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mitochondria 1983*, pp. 411-424, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Schweyen,R.J., Wolf,K. and Kaudewitz,F.)

Price,J., Kieft,G., Kent,J.R., Sievers,E.L. and Cech,T.R. (1986): Sequence requirements for self-splicing of the *Tetrahymena thermophila* pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 13,1871-1889

- Putrament, A., Baranowska, H. and Prazmo, W. (1973): Induction by manganese of mitochondrial antibiotic resistance mutations in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **126**, 357-366
- Quigley, G.J., Teeter, M.M. and Rich, A. (1978): Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 64-68
- Ratzkin, B. and Carbon, J. (1977): Functional expression of cloned yeast DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 487-491
- Rigby, P.W., Dieckman, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977): Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251
- Rothstein, R. (1983): One-step gene disruption in yeast. *Methods in Enzymology*. Academic Press (eds.: Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K.) **101**, 203-211
- Ruskin, B., Krainer, A.R., Maniatis, T. and Green, M.R. (1984): Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**, 317-331
- Rykowski, M.C., Wallis, J.W., Choe, J. and Grunstein, M. (1981): Histone H2B subtypes are dispensable during yeast cell cycle. *Cell* **25**, 477-487
- Saccone, C., Attimonelli, M. and Sbisa, E. (1985): Primary and higher order structural analysis of animal mitochondrial DNA. In: *Achievements and perspectives of mitochondrial research. Vol. II/ Biogenesis*, pp. 37-48, Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello, E., Slater, E.C., Palmieri, F., Saccone, C. and Kroon, A.M.)
- Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M.P.H., Meijlink, F.C.P.W. and Borst, P. (1977): The organization of genes in yeast mitochondrial DNA III. Comparison of the physical maps of the mutated DNA from three wildtype *S. cerevisiae* strains. *Mol. Gen. Genet.* **157**, 239-261
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Schatz, G. and Butow, R.A. (1983): How are proteins imported into mitochondria. *Cell* **32**, 316-318
- Scheller, R.H. (1977): Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning. *Science* **126**, 177
- Schmelzer, C. (1981): Dissertation, Universität München
- Schmelzer, C., Haid, A., Grosch, G., Schueyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1981): Pathways of transcript splicing in yeast mitochondria - mutations in intervening sequences of the split gene COB reveal a requirement for intervening sequence-encoded products. *J. Biol. Chem.* **256**, 7610-7619

Schmelzer, C., Schmidt, C. and Schweyen, R.J. (1982): Determination of splicing signals in introns of yeast mitochondrial split genes: mutational alterations in intron bII and secondary structures in related introns. *Nucleic Acids Res.* 10, 6797-6808

Schmelzer, C., Schmidt, C., May, K. and Schweyen, R.J. (1983): Determination of functional domains in intron bII of yeast mitochondrial RNA by studies of mitochondrial mutations and a nuclear suppressor. *Embo J.* 2, 2047-2052

Schmelzer, C. and Schweyen, R.J. (1986): Self-splicing of group II Introns in vitro: Mapping of the branchpoint and mutational inhibition of lariat formation. *Cell* 46, im Druck

Schweyen, R.J., Backhaus, B., Mathews, S., Kaudewitz, F. (1976): On the formation of rho⁻ petites in yeast. V. Mapping by rho⁻ deletion analysis and rho⁺ x rho⁻ recombination analysis of mitochondrial genes in *S. cerevisiae*. In: *Genetics, biogenesis and bioenergetics of mitochondria*, pp. 7-22, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F.)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaudewitz, F. (1977): The genetic map of the mitochondrial genome including the fine-structure of COB and OXI 3 clusters. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria*, pp. 139-149, Walter de Gruyter, Berlin-New York (eds.: Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.)

Sciliano, P. and Tatchell, K. (1984): Transcription and regulatory signals at the mating type locus in yeast. *Cell* 37, 969-978

Sharp, P.A. (1985): On the origin of RNA-splicing and introns. *Cell* 42, 397-400

Shine, J. and Dalgarno, L. (1975): Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature (London)* 254, 34-38

Simon, M. and Faye, G. (1984): Steps in processing of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I pre-mRNA affected by a nuclear mutation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 8-12

Slonimski, P.P., Perrodin, G. and Croft, I.H. (1968): Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient chromosomal petites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 232

Solnick, D. (1986): Alternative Splicing caused by RNA secondary structure. *Cell* 43, 667-676

Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* 28, 503-517

Strauss, G. (1981): Specificity of the mutagenic action of the alkylating agents. *Nature (London)* 121, 730-731

Struhl, K. (1983): Direct selection for gene replacement events in

Tatchell,K., Chaleff,T., DeFeo-Jones,D. and Scolnick,E.M. (1984): Requirement of ras-related genes of *S. cerevisiae* for spore viability. *Nature* (London) 302,523-527

Teem,J.L., Abovich,N., Kaufer,N.F., Schwindinger,W.F., Warner,J.R., Levy,A., Woolford,J., Leer,R.J., van Ramsdonk-Duin,M.M.C., Mager,W.H., Panta,R.J., Schultz,L., Friesen,J.D., Fried,H. and Rosbash,M. (1984): A comparison of yeast ribosomal protein gene DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 12,8295-8312

Terpstra,P.E., Zanders,R.A. and Butow,R.A. (1979): The association of VAR1 with the 28S mitochondrial ribosomal subunit in yeast. *J.Bio.Chem.* 254,12653-12661

Thomas,P. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77,5201-5205

Toh-e,A. and Wickner,R.B. (1981): Curing of the 2 μ -DNA plasmid from *S. cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 145,1421-1424

Trinkl,H., Lang,B.F. and Wolf,K. (1985): The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Continuous gene for apocytochrome b in strain EF1 (CBS 356) and sequence variation in the region of the intron insertion in strain ade7-50h⁻. *Mol.Gen.Genet.* 128,360-363

Trinkl,H. and Wolf,K. (1986): The mosaic cox1 gene in the mitochondrial genome of *Schizosaccharomyces pombe*: minimal structural requirements and evolution of group I introns. *Gene*, im Druck

Tzagoloff,A., Crivellone,M., Gampel,A., Hill,J., Koerner,T.J., Myers,A. and Pape,L. (1985): Characterization of yeast nuclear genes coding for mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. In: *Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol II/Biogenesis*, pp. 371-379, Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello,E., Slater,E.C., Palmieri,F., Saccone,C. and Kroon,A.M.)

Van der Horst,G. and Tabak,H.F. (1985): Self-splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors. *Cell* 40,759-766

Van der Veen,R., Arnberg,A.C., van der Horst,G., Bonen,L., Tabak,H.F. and Grivell,L.A. (1986): Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing in vitro. *Cell* 44,225-234

Vierny,C., Keller,A.M., Begel,V. and Belcour,L. (1982): A sequence of mitochondrial DNA is associated with the onset of senescence in a fungus. *Nature* (London) 227,157-159

Waring,R.B. and Davies, R.W. (1984): Assessment of a model for intron RNA secondary structure relevant to RNA self-splicing-a review. *Gene* 28,277-291

- Weiss-Brummer,B., Rüdell,G., Schweyen,R.J. and Kaudewitz,F. (1982): Expression of the split gene COB in yeast- evidence for a precursor of a maturase protein translated from intron 4 and preceding exons. *Cell* 22,527-536
- Weiss-Brummer,B., Holl,J., Rüdell,G., Schweyen,R.J. and Kaudewitz,F. (1983): Processing of yeast mitochondrial RNA: Involvement of intermolecular hybrids in splicing of COB intron 4 RNA as revealed by mutation and reversion. *Cell* 33,195-202
- Weiss-Brummer,B., Hüttenhofer,A. and Kaudewitz,F. (1984): Leakiness of termination codons in mitochondrial mutants of the yeast *S. cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* 128,62-68
- Wieringa,B., Meyer,F., Reiser,J. and Weissmann,C. (1983): Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit β -globine gene. *Nature (London)* 301,38-45
- Wilde,C.D., Growther,C.E. Cripe,T.P., Lee,M.G. and Cowan,N.J. (1982): Evidence, that an human β -tubuline pseudogene is derived from its corresponding mRNA. *Nature (London)* 227,83-84
- Zamaroczy,M. and Bernardi,G. (1985): The organization and evolution of the mitochondrial genome of yeast: ori sequences, genes and intergenic sequences. In: Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol.II/Biogenesis, pp. 89-98, Elsevier, Amsterdam (eds.: Quagliariello,E., Slater,E.C., Palmieri,F., Saccone,C. and Kroon,A.M.)
- Zaret,K.S. and Sherman,F. (1982): DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* 28,563-573
- Zaug,A.J., Grabowski,P.J. and Cech,T.R. (1983): Autocatalytic cyclization of an excized intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. *Nature (London)* 301,578
- Zaug,A.J. and Cech,T.R. (1986): The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science* 231,470-475
- Zitomer,R.S., Walthall,D.A., Raymond,B.C. and Hollenberg,C.P. (1984): *S. cerevisiae* ribosomes recognize non-AUG initiation codons. *Mol.Cell.Biol.* 4,1191-1197

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. R.J. Schveyen für die Bereitstellung des Themas, die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Des weiteren danke ich Dr. A. Haid, Dr. C. Schmelzer und Dr. J. Zimmermann für die Beratung und Unterstützung bei methodischen Fragestellungen.

Dr. G. Rüdel danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und für wertvolle Anregungen.

Frau U. Breit und Frau E. Pretzel gilt mein Dank für die Unterstützung bei technischen Arbeiten.

Außerdem bedanke ich mich bei allen anderen Institutsangehörigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

11.4.1956	geboren in Traunstein
1962-1967	Grundschule Traunwalchen
1967-1970	Gymnasium in Ingolstadt
1970-1976	Gymnasium in Neuburg/Donau
1976-1978	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
1978-1982	Studium der Biologie an der LMU München
1981-1982	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie
1982	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr. R.J.Schweyen am Institut für Genetik und Mikrobiologie

